

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-134104

(43)公開日 平成8年(1996)5月28日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 8 B 37/00		G 7433-4C		
A 2 3 L 1/30		B		
A 6 1 K 31/715	ADD			
C 1 2 N 9/10				
C 1 2 P 19/18		7432-4B		

審査請求 未請求 請求項の数28 O L (全 33 頁)

(21)出願番号 特願平7-195647

(22)出願日 平成7年(1995)7月31日

(31)優先権主張番号 特願平6-218554

(32)優先日 平6(1994)9月13日

(33)優先権主張国 日本 (J P)

(71)出願人 000000228

江崎グリコ株式会社

大阪府大阪市西淀川区歌島4丁目6番5号

(72)発明者 高田 洋樹

兵庫県神戸市須磨区清水台1番8号 1-813

(72)発明者 鷹羽 武史

兵庫県神戸市北区日の峰4-7-16

(72)発明者 岡田 茂孝

奈良県生駒市東生駒3丁目207-269

(72)発明者 今中 忠行

大阪府吹田市藤白台2丁目28番11号

(74)代理人 弁理士 山本 秀策

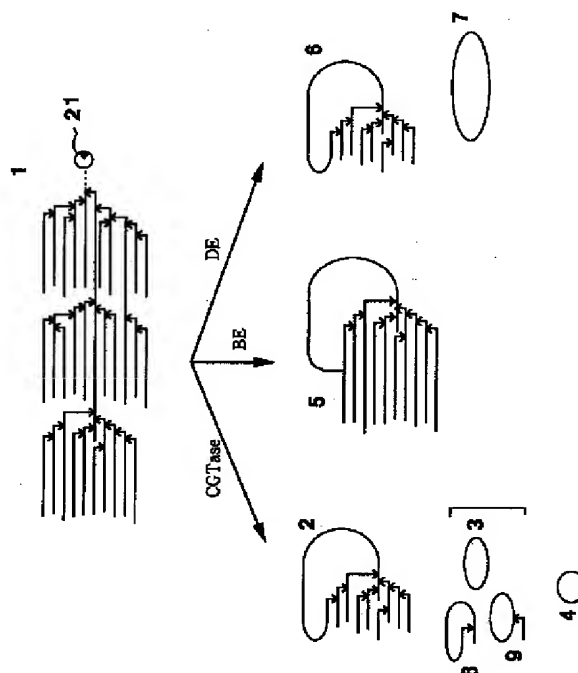
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 環状構造を有するグルカンおよびその製造方法

(57)【要約】

【課題】澱粉の代替物としての、環状構造を有するグルカンを提供すること。

【解決手段】 α -1, 4-グルコシド結合と α -1, 6-グルコシド結合とを有する糖類と、該糖類に作用して環状構造を形成し得る酵素とを反応させて、内分岐環状構造部分と外分岐構造部分とを有する、重合度が50以上であるグルカンを製造する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 内分岐環状構造部分と外分岐構造部分とを有する、重合度が50以上であるグルカン。

【請求項2】 前記グルカンの重合度が50から5000の範囲にある、請求項1に記載のグルカン。

【請求項3】 前記内分岐環状構造部分の重合度が、10から100の範囲である、請求項1または2に記載のグルカン。

【請求項4】 前記外分岐構造部分の重合度が、40以上である、請求項1ないし3いずれかの項に記載のグルカン。

【請求項5】 前記外分岐構造部分の各単位鎖の重合度が、平均で10から20である、請求項4に記載のグルカン。

【請求項6】 内分岐環状構造部分と外分岐構造部分とを有する重合度が50以上であるグルカンと、 $\alpha-1$ 、4-グルコシド結合のみを有する環状構造を有するグルカンとの混合物。

【請求項7】 内分岐環状構造部分と外分岐構造部分とを有する、重合度が50以上であるグルカンの製造方法であって、該方法は、

$\alpha-1$ 、4-グルコシド結合と $\alpha-1$ 、6-グルコシド結合とを有する糖類と、該糖類に作用して環状構造を形成し得る酵素とを反応させることを含む、方法。

【請求項8】 前記糖類が澱粉である、請求項7に記載の方法。

【請求項9】 前記糖類がアミロペクチンである、請求項7に記載の方法。

【請求項10】 前記酵素が枝作り酵素である、請求項7から9いずれかの項に記載の方法。

【請求項11】 前記酵素がD酵素である、請求項7から9いずれかの項に記載の方法。

【請求項12】 前記酵素がサイクロデキストリングルカノトランスフェラーゼである、請求項7から9いずれかの項に記載の方法。

【請求項13】 前記サイクロデキストリングルカノトランスフェラーゼが、*Alkalophilic Bacillus* sp. A2-5a由来の酵素である、請求項12に記載の方法。

【請求項14】 前記グルカンの重合度が50から5000の範囲にある、請求項7から13いずれかの項に記載の方法。

【請求項15】 前記内分岐環状構造部分の重合度が、10から100の範囲である、請求項7ないし14いずれかの項に記載の方法。

【請求項16】 前記外分岐構造部分の重合度が、40以上である、請求項7ないし15いずれかの項に記載の方法。

【請求項17】 前記外分岐構造部分の各単位鎖の重合度が、平均で10から20である、請求項16に記載の方法。

【請求項18】 内分岐環状構造部分と外分岐構造部分とを有する、重合度が50以上であるグルカンの製造方法であって、該方法は、

$\alpha-1$ 、4-グルコシド結合のみを有する糖類と、枝作り酵素とを反応させることを含む、方法。

【請求項19】 内分岐環状構造部分と外分岐構造部分とを有する重合度が50以上であるグルカンと、 $\alpha-1$ 、4-グルコシド結合のみを有する環状構造を有するグルカンとの混合物の製造方法であって、該方法は、 $\alpha-1$ 、4-グルコシド結合と $\alpha-1$ 、6-グルコシド結合とを有する糖類と、該糖類に作用して環状構造を形成し得る酵素とを反応させることを含む、方法。

【請求項20】 前記糖類が澱粉である、請求項19に記載の方法。

【請求項21】 前記糖類がアミロペクチンである、請求項19に記載の方法。

【請求項22】 前記酵素がD酵素である、請求項19から21いずれかの項に記載の方法。

【請求項23】 前記酵素がサイクロデキストリングルカノトランスフェラーゼである、請求項19から21いずれかの項に記載の方法。

【請求項24】 請求項1に記載のグルカン含有する、食食用組成物。

【請求項25】 請求項1に記載のグルカン含有する、食品添加用組成物。

【請求項26】 請求項1に記載のグルカン含有する、輸液。

【請求項27】 請求項1に記載のグルカン含有する、接着用組成物。

【請求項28】 請求項1に記載のグルカン含有する、老化防止剤。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

【発明が属する技術分野】本願発明は、澱粉加工工業における原料、食食用組成物、食品添加用組成物、糊料あるいは生物崩壊性プラスチック用の澱粉の代替物質として有用な、グルカンあるいはその誘導体、およびその製造方法に関する。

【0002】更に詳しくは、内分岐環状構造部分と外分岐構造部分とを有する、重合度が50以上であるグルカンおよびその製造方法に関する。

【0003】

【従来の技術】澱粉は、マルトース、水飴類、またはサイクロデキストリンなどの製造のための原料、食食用組成物、食品添加用組成物、糊料あるいは生物崩壊性プラスチック用素材として用いられている高分子物質である。しかし、既存の澱粉には、溶解性が低いこと、老化しやすいこと、および高い粘度を有すること、という問題点がある。具体的には、澱粉は、一般的に水に対する溶解度が低い。従って、澱粉を溶解するためには、加熱

処理、または、有機溶媒、酸、あるいはアルカリなどにより処理を行うことが必要である。

【0004】溶解した澱粉もしくは糊化した澱粉は、迅速に老化し、不溶性の沈澱を形成する。澱粉の老化は、澱粉溶液の粘弾性、澱粉の接着性などの物性を変化させる、あるいは、澱粉質を含有する食品においては、保水性、保形性、冷凍耐性、または消化性を低下させるなどの問題を引き起こしている。

【0005】さらに、糊化した澱粉は、高い粘度を有する。これは、澱粉中のアミロペクチンが、房状構造が多数連なった非常に長い分子であることに起因する。高粘度であるため、澱粉を、マルトースあるいはサイクロデキストリンなどを製造するための原料として用いる場合、取り扱いが困難であるという問題がある。例えば、一定濃度以上の糊化した澱粉を用いた場合には、製造時に輸送用のパイプが詰まることがある。

【0006】このように、既存の澱粉が有する上記性質（溶解性の低さ、老化性、および高粘度）は、食品およびその他の産業において、澱粉の利用を制限するものであった。

【0007】そこで、これらの澱粉を低分子化させることにより、溶解性および耐老化性を向上させる研究が行われ、ある程度は、老化を防止し得るようになった。しかし、過剰な分子量低下を抑えることは困難であり、高分子である本来の澱粉の持つ固有の性質を失うという問題が生じた。さらに、これらの方法では、澱粉の還元力が増加するため、タンパク質やアミノ酸などと混合して加熱した際に、これらの物質との反応により、澱粉が着色してしまうため、その用途は制限されていた。一方で、これらの澱粉を低分子化することなく、溶解性を向上させる研究が行われ、澱粉の $\alpha-1, 4$ -結合を切断し、 $\alpha-1, 6$ -結合を転移反応により合成する酵素（Q-酵素、EC 2.4.1.18）、すなわち枝作り酵素を澱粉に反応させて、水溶性澱粉が得られている（特開昭60-75295号公報）。しかし、この方法で得られた水溶性澱粉は、原料として用いた澱粉と同程度の分子量を有する高分子物質であり、上記澱粉が有する問題点を解決するものではなかった。

【0008】他方、上記澱粉の代替物として、D-グルコースからなる環状の糖類、すなわち環状グルカンを使用することが考えられる。

【0009】この環状グルカンとしては、サイクロデキストリン類が既に知られている。サイクロデキストリン類は、通常、澱粉等にサイクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ（以下、CGTaseという）を反応させて製造されている。

【0010】澱粉にCGTaseを作用させることによりサイクロデキストリン（CD）を合成すると、通常6から8の重合度を有するサイクロデキストリン（ α -CD、 β -CD、および γ -CD）が生産される。この α -

β -あるいは γ -CDでは、澱粉の代替物とはなり得ないため、さらに重合度の大きいサイクロデキストリンが必要となる。

【0011】重合度が9から13のサイクロデキストリン類が、澱粉にCGTaseを作用させて合成されている（Archives of Biochemistry and Biophysics vol.111 153-165 (1965)が、その収量は極めて低い。さらに重合度が大きい環状のグルカンについては、開示されていない。

【0012】特開平6-62883は、高重合度のCDを開示しているが、その重合度は、最高28程度である。しかも、内分岐CDを含まない ϵ -（重合度10）、 η -（重合度12）、 θ -（重合度13）のCDにマルトースを過剰に加えてプルラナーゼを作用させて製造され得るという可能性を示唆しているにすぎない。

【0013】ところで、上記Archives of Biochemistry and Biophysics vol.111 153-165(1965)には、 $\alpha-1, 4$ -グルコシド結合からなる環状構造内部に $\alpha-1, 6$ -結合を有するグルカン（内分岐グルカン、あるいは内分岐CD）、あるいは、環状 $\alpha-1, 4$ -グルカンの外部に $\alpha-1, 6$ -結合を有するグルカン（外分岐グルカン、あるいは外分岐CD）が副産物として生産されることが記載されている。

【0014】内分岐グルカンは、特開平6-62883に、内分岐構造を有するサイクロデキストリンとしてその構造が記載されている。この公開公報には、内分岐サイクロデキストリンは、環に大きなひずみがかかる重合度10から13の大環状サイクロデキストリンにのみ存在すること、および環内に存在する $\alpha-1, 6$ -結合の個数は、多数個の可能性も示唆されているものの、分析した範囲ではすべて1個であったことが記載されている。

【0015】外分岐グルカンについては、その製法と構造が、特開昭63-46201および特開昭64-74997に記載されている。これらの公開公報には、分岐デキストリンとサイクロデキストリンとを混合し、枝きり酵素を作用させて、外分岐サイクロデキストリンを製造したことが記載されている。しかし、反応に使用したサイクロデキストリンが内分岐環状構造を有していないので、内分岐環状構造部分と外分岐構造とを有するグルカンは、開示されていない。さらに、環状構造部分は、重合度6-8であり、分岐構造部分は、せいぜい重合度6のマルトオリゴ糖あるいは分岐マルトオリゴ糖が結合しているものにすぎない。

【0016】以上のように、上記澱粉の代替物として、サイクロデキストリンを使用することが考えられたが、いずれも重合度は小さく、代替物となり得ない。また、内分岐あるいは外分岐を有するCDも開示されているが、重合度が小さく、澱粉の代替物としては、使用できない。さらに、内分岐あるいは外分岐構造を有するCD

も開示されているが、重合度の高いCDの生産は極めて微量であるから、澱粉の代替物としての環状グルカンを大量に生産することはきわめて困難であるというのが現状である。

【0017】従って、澱粉の代替となり得る分子量の大きい環状グルカンの簡易な製造方法が望まれていた。

【0018】

【発明が解決しようとする課題】本願発明は、上記問題を解決することを目的とするものである。本願発明は、既存の澱粉と比較して、水に対する溶解度が高く、かつ溶解した溶液の粘度が低く、そして通常の澱粉に観察される老化が起こらないという優れた性質を有する環状グルカンであって、澱粉の代替物質として有用な物質の新規な製造方法を提供することを目的とする。

【0019】

【課題を解決するための手段】本願発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、従来、環状化反応を触媒するとは考えられなかった1, 4- α -グルカン分枝酵素（枝作り酵素、Q酵素）および4- α -グルカノトランスフェラーゼ（D酵素、不均化酵素）が、澱粉に作用して環状グルカンを合成し得ることを初めて見だし、本願発明に至ったものである。さらに、本願発明者らは、CGTaseの反応機構として、従来知られていた機構とは異なる反応機構を見出した。その反応機構に基づいて、CGTaseを用いて、分岐を有する環状グルカンを合成し得ることを発見し、これを利用して本願発明を完成させたものである。

【0020】本願発明は、内分岐環状構造部分と外分岐構造部分とを有する、重合度が50以上であるグルカン（以下、本願発明のグルカンという）に関する。

【0021】好適な実施態様においては、前記グルカンの重合度が50から5000の範囲にある。

【0022】好適な実施態様においては、前記グルカンの内分岐環状構造部分の重合度が、10から100の範囲である。

【0023】好適な実施態様においては、前記グルカンの外分岐構造部分の重合度が、40以上である。

【0024】好適な実施態様においては、前記外分岐構造部分の各単位鎖の重合度が、平均で10から20である。

【0025】さらに、本願発明は、内分岐環状構造部分と外分岐構造部分とを有する重合度が50以上であるグルカンと、 α -1, 4-グルコシド結合のみを有する環状構造を有するグルカンとの混合物に関する。

【0026】さらに、本願発明は、内分岐環状構造部分と外分岐構造部分とを有する、重合度が50以上であるグルカンの製造方法であって、該方法は、 α -1, 4-グルコシド結合と α -1, 6-グルコシド結合とを有する糖類と、該糖類に作用して環状構造を形成し得る酵素とを反応させることを含む。

【0027】好適な実施態様においては、前記糖類が澱粉、あるいはアミロペクチンである。好適な実施態様においては、前記酵素が枝作り酵素、D酵素、あるいはサイクロデキストリングルカノトランスフェラーゼである。

【0028】さらに好適な実施態様においては、前記サイクロデキストリングルカノトランスフェラーゼが、*Alkalophilic Bacillus* sp. A2-5a由来の酵素である。

【0029】好適な実施態様においては、前記グルカンの重合度が50から5000の範囲にある。

【0030】好適な実施態様においては、前記グルカンの内分岐環状構造部分の重合度が、10から100の範囲である。

【0031】好適な実施態様においては、前記グルカンの外分岐構造部分の重合度が、40以上である。

【0032】好適な実施態様においては、前記外分岐構造部分の各単位鎖の重合度が、平均で10から20である。

【0033】本願発明は、さらに、内分岐環状構造部分と外分岐構造部分とを有する、重合度が50以上であるグルカンの製造方法であって、該方法は、 α -1, 4-グルコシド結合のみを有する糖類と、枝作り酵素とを反応させることを含む。

【0034】本願発明は、また、内分岐環状構造部分と外分岐構造部分とを有する重合度が50以上であるグルカンと、 α -1, 4-グルコシド結合のみを有する環状構造を有するグルカンとの混合物の製造方法であって、該方法は、 α -1, 4-グルコシド結合と α -1, 6-グルコシド結合とを有する糖類と、該糖類に作用して環状構造を形成し得る酵素とを反応させることを含む。

【0035】好適な実施態様においては、前記糖類が澱粉、あるいは、アミロペクチンである。

【0036】好適な実施態様においては、前記酵素がD酵素あるいはサイクロデキストリングルカノトランスフェラーゼである。

【0037】本願発明は、さらに、上記グルカンを含む、飲食用組成物、食品添加用組成物、輸液、接着用組成物および澱粉の老化防止剤に関する。

【0038】本願発明の方法により、上記目的が達成され得る。

【0039】

【発明の実施の形態】以下、本願発明を詳細に説明する。

【0040】（本願発明の概略）図1は、本願発明の、内分岐環状構造部分と外分岐構造部分とを有する、重合度が50以上のグルカンの製造方法のひとつを示す模式図である。図1において、水平の直線および曲線は、 α -1, 4-グルコシド結合でつながったグルカンの鎖を示し、垂直の矢印は、 α -1, 6-グルコシド結合を示す。図1の21は還元末端を示す。白ぬり三角は酵素が

アタックしたグルコシド結合を、黒ぬり三角は酵素作用により新たに合成されたグルコシド結合を示す。(以下の模式図における水平の直線、曲線、および垂直の矢印、白ぬり三角、および黒ぬり三角も同様である)。

【0041】本願発明は、 $\alpha-1$ 、4-グルコシド結合と $\alpha-1$ 、6-グルコシド結合とを有するアミロペクチンに、CGTase、枝作り酵素(BEと表す)、あるいはD酵素(DEと表す)を作用させると、図1の2、5、および6で示される内分岐環状構造部分と外分岐構造部分とを有する、重合度が50以上のグルカンが得られることを発見して完成されたものである。図2は、図1で得られた反応生成物のゲル透過パターンである。いわゆる大環状CDといわれる図1の3、内分岐CDといわれる図1の8、外分岐CDといわれる図1の9、そしてCD(図1の4)等よりも分子量が大きい、原料よりは明らかに分子量が小さい。

【0042】図1における2、5、あるいは6で示されるように、内分岐環状構造部分とその環状構造に結合した外分岐構造部分とからなり、重合度が50以上のグルカンが、本願発明の方法で得られたグルカンである。その態様は、図3に示される。内分岐環状構造部分とは、本願明細書においては、 $\alpha-1$ 、4-グルコシド結合と $\alpha-1$ 、6-グルコシド結合とで形成される環状構造部分をいう。

【0043】外分岐構造部分とは、本願明細書においては、前記内分岐環状構造に結合した非環状構造部分をいう。

【0044】なお、本願発明においては、上記グルカンという用語には、グルカンの誘導体が含まれる。さらに、本願発明の方法においては、原料という用語には誘導体化された原料が含まれる。

【0045】(酵素)本願発明に使用し得る酵素としては、 $\alpha-1$ 、4-グルコシド結合および少なくとも1個の $\alpha-1$ 、6-グルコシド結合を有する糖類に作用して、重合度が50以上であって、環状構造を有するグルカンを形成し得る酵素であれば、いずれをも使用し得る。使用し得る酵素としては、1、4- α -グルカン分枝酵素(枝作り酵素、Q酵素)、4- α -グルカノトランスフェラーゼ(D酵素、アミロマルターゼ、不均化酵素)、サイクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ(CGase)等が挙げられるが、これらに限定されない。

【0046】これらの酵素が、内分岐環状構造部分と外分岐構造部分とを有する、重合度が50以上のグルカンを生産することは、従来知られている酵素の作用機構を考慮すると、驚くべきことである。

【0047】枝づくり酵素は、澱粉系の糖類の $\alpha-1$ 、4-グルカン鎖の一部を6位に転移して分枝を作る酵素である。従って、この枝作り酵素が、環状構造を形成し得るとは全く予想が出来ないものである。

【0048】さらに、D酵素(ディスプロポーショナーティングエンザイム)(EC 2.4.1.25)は、マルトオリゴ糖の糖転移反応(不均一化反応)を触媒する酵素であり、供与体分子の非還元末端からグルコシル基あるいは、マルトシルもしくはマルトオリゴシルユニットを受容体分子の非還元末端に転移する酵素である。従って、酵素反応の結果、最初に与えられたマルトオリゴ糖の重合度の不均一化がおこる。この不均一化反応は、例えば、可溶性澱粉あるいはアミロース等の高分子量の澱粉を供与体とし、グルコースあるいはマルトオリゴ糖を受容体としたときにおこることが知られている。従って、このD酵素を澱粉に作用させた場合、重合度の異なる糖類が生じることは予想し得ても、枝作り酵素と同様に、環状化糖を形成し得るとは全く予想ができないものである。

【0049】また、CGaseも、従来とは異なる反応機構を有するものであることが明らかとなり、本願発明に至ったものである。従って、本願発明は、従来、重合度が高く、かつ環状構造を有するグルカンを生産することが不可能と思われていた酵素を用いて、環状グルカンの新たな製造方法を提供するものである。以下、CGaseの新たな反応について説明する。

【0050】従来考えられていたCGaseの反応を図4を用いて説明する。図4Aに示すように、アミロース11の様な $\alpha-1$ 、4-グルカンにCGaseを作用させた場合、本酵素はアミロース分子の非還元末端から6から8個のグルコース鎖を認識してこの部分を環状化させるように転移反応を行い、元の基質からの最終的な産物は、重合度6-8の環状マルトオリゴ糖(α 、 β -および γ -CD)12と少量の非環状オリゴ糖13になると考えられていた。

【0051】また、図4Bに示すように、CGaseをアミロペクチン14に作用させた場合も、アミロペクチン側鎖の非還元末端の6から8個のグルコース鎖を認識してこの部分を環状化させるように転移反応を行い、重合度6-8のCD12と非環状リミットデキストリン15になると考えられていた。

【0052】他方、本願発明者らは、CGaseをアミロペクチンに作用させた際の、生産物のゲル透過クロマトグラフィーの溶出パターンの変化を検討した。図5にその結果を示す。ポイドボリュームの位置に溶出されていたアミロペクチンは、酵素反応の経過とともに、低分子化し、主として2つの低分子ピーク(IおよびII)を生じた。このうちピークIIは低分子のCD(α -および β -CD)であった。またIとIIの間の小さなピークは、重合度9-14程度の大環状CD、内分岐CD、外分岐CD、リニアなマルトオリゴ糖の混合物のピークであった。一方、ピークIはこれらのCDよりも明らかに高分子であるが、アミロペクチンよりは明らかに小さい。これらの結果は、図4Bのメカニズムでは説明ができず、より大きな環状化反応(図6)を考えることによ

り説明がつく。

【0053】もし、このような環状化反応が起こっている場合、環状構造部分はグルコアミラーゼにより分解されないため、グルコアミラーゼに耐性を示すグルカンが生じているはずである。

【0054】そこで、図5の各反応時間の生産物中のCD量、CD以外のグルコアミラーゼ耐性グルカン量を求めた。なおここで反応液中のCD量は、 α 、 β 、 γ -CDをそれぞれHPLC法により定量して求めた。グルコアミラーゼ耐性グルカン量はグルコアミラーゼにより分解されないグルコース量を測定して求めた。CD以外のグルコアミラーゼ耐性グルカン量はグルコアミラーゼ耐性グルカンの全量からCD量を差し引くことにより求めた。図7に示したように、CGTaseを作用させることにより、明らかにCD以外のグルコアミラーゼ耐性グルカンがつくられていることがわかった。従って、図5でみられた、アミロペクチンの低分子化産物ピークIは、図6のような大きな環状化反応により起こっていることが考えられる。

【0055】そこで、低分子化反応物ピークIを分取し、これをさらに分析したところ、この物質が α -1, 6-結合を含む環状構造を有するグルカンであることが証明できた。このことは、CGTaseをアミロペクチンに作用させた場合にも、これまで知られていたような、CD合成反応以外に、 α -1, 6-結合を含む環状化反応を触媒する事が証明されたことを示している。

【0056】以上のように、本願発明は、糖類に作用する種々の酵素に、環状構造を形成し得る能力があることを見いだして本願発明を完成させたものであり、環状構造を形成し得る能力がある酵素はすべて、本願発明に含まれ得る。

【0057】(枝作り酵素) 枝づくり酵素は、種々の植物、動物、細菌等の微生物に存在しており、その起源は問わない。反応最適温度が高い点から、好熱性細菌由来の枝作り酵素遺伝子をクローン化した大腸菌から精製された枝作り酵素が、あるいは、大量の酵素が得易い点から、馬鈴薯由来の枝作り酵素が好ましい。

【0058】(D酵素) D酵素としては、種々の植物、あるいは微生物に由来するものが使用され得、市販の酵素も使用され得る。D酵素は最初、馬鈴薯から発見されたが、馬鈴薯以外にも、種々の植物および大腸菌などの微生物に存在することが知られている。この酵素は、植物に由来する場合にはD酵素、微生物に由来する場合にはアミロマルターゼと呼ばれている。従って、D酵素はその起源は問わず、植物由来の酵素をコードする遺伝子を大腸菌などの宿主を用いて発現させたものであっても使用し得る。

【0059】(CGTase) CGTaseとしては、周知の微生物由来のCGTase、あるいは市販のCGTaseが用いられ得る。微生物由来のCGTaseと

しては、好適には、市販のBacillus stearothermophilus

由来のCGTase (株式会社林原生物化学研究所、岡山)、Bacillus macerans由来のCGTase (商品名: コンチザイム、天野製薬株式会社、名古屋)、あるいはAlkalophilic Bacillus sp. A2-5a由来のCGTaseが用いられ得る。より好適には、Alkalophilic Bacillus sp. A2-5a由来のCGTaseが用いられ得る。Alkalophilic Bacillus sp. A2-5aは、特開平7-107972号に開示されているアルカリ域で高い活性を有するCGTaseを産生する株であり、出願人によって、工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号(FERM P-13864)として寄託されている。

【0060】上記枝作り酵素、D酵素、あるいはCGTaseは、澱粉分子内の α -1, 4-または α -1, 6-グルコシド結合を加水分解するエンド型のアミラーゼ類の酵素活性が検出されなければもしくは非常に弱ければ、精製段階の粗酵素であっても、本願発明のグルカンの製造に使用し得る。

【0061】また、本願発明に用いる酵素は、精製酵素、粗酵素を問わず、固定化されたものでも反応に使用し得、反応の形式は、バッチ式でも連続式でもよい。固定化の方法としては、担体結合法、(たとえば、共有結合法、イオン結合法、あるいは物理的吸着法)、架橋法あるいは包括法(格子型あるいはマイクロカプセル型)等、当業者に周知の方法が使用され得る。

【0062】(使用する原料: 基質) 本願発明に使用する原料としては、 α -1, 4-グルコシド結合および少なくとも1個の α -1, 6-グルコシド結合を有する糖類が用いられ得る。このような糖類としては、澱粉、澱粉の部分分解物、アミロペクチン、グリコーゲン、ワキシー澱粉、ハイアミロース澱粉、可溶性澱粉、デキストリン、澱粉加水分解物、ホスホリラーゼによる酵素合成アミロペクチンなどが挙げられる。

【0063】澱粉としては、通常市販されている澱粉であればどのような澱粉でも用いられ得る。例えば、馬鈴薯澱粉、甘藷澱粉、くず澱粉、タピオカ澱粉などの地下澱粉、コーンスターチ、小麦澱粉、米澱粉などの地上澱粉が用いられ得る。

【0064】澱粉の部分分解物としては、上記澱粉を酵素や酸などで部分的に加水分解したもの、澱粉の枝切り物が挙げられる。

【0065】アミロペクチンとしては、特にアミロペクチン100%からなるワキシーコーンスターチが、製造されるグルカンの分子量分布がより均一となるため、好適に用いられ得る。例えば、重合度が約600程度以上のアミロペクチンが原料として用いられ得る。

【0066】また、枝作り酵素を用いる場合には、 α -1, 4-結合のみを有するグルカンも原料として用いられ得る。 α -1, 4-グルコシド結合のみを有する糖類としては、アミロース、澱粉の部分分解物、澱粉枝切り

物、ホスホリラーゼによる酵素合成アミロース、マルトオリゴ糖などが挙げられる。重合度が約400以上のアミロースが好適に用いられ得る。

【0067】また、原料としては、上記澱粉あるいは澱粉の部分分解物等の誘導体も用いられ得る。例えば、上記澱粉のアルコール性の水酸基の少なくとも1つが、グリコシル化、ヒドロキシアルキル化、アルキル化、アセチル化、カルボキシメチル化、硫酸化、あるいはリン酸化された誘導体なども用いられ得る。さらに、これらの2種以上の混合物も原料として用いられ得る。

【0068】(酵素と原料との反応)本願発明のグルカンの製造方法における、上記原料と上記酵素とを反応させる工程は、本願発明のグルカンが生成するpH、温度などの反応条件であれば、いずれもが用いられ得る。上記原料の濃度(基質濃度)も、反応条件等を考慮して決定され得る。

【0069】酵素が枝作り酵素である場合には、反応のpHは、通常約3から約11である。反応速度、効率、酵素の安定性などの点から、好ましくは約4から約10、さらに好ましくは約7から約9である。温度は、約10℃から約110℃、反応速度、効率、酵素の安定性などの点から、好ましくは約20℃から約90℃である。基質濃度は、通常約0.05%から約60%程度、反応速度、効率、基質溶液の取り扱い易さなどの点から、好ましくは約0.1%から約30%程度である。使用する酵素量は、基質1gあたり、通常約50~10,000単位である。

【0070】酵素がD酵素である場合には、反応のpHは、通常、約3から約10、反応速度、反応効率、酵素の安定性などの点から、好ましくは約4から約9、さらに好ましくは、約6から約8である。温度は、約10℃から約90℃、反応速度、反応効率、酵素の安定性などの点から、好ましくは約20℃から約60℃、さらに好ましくは、約30℃から約40℃の範囲である。耐熱性の微生物などから得られる酵素を用いる場合は、約50℃から約110℃の高温で使用し得る。原料の濃度(基質濃度)も、反応条件等を考慮して決定し得る。通常、約0.1%から約50%程度、反応速度、効率、基質溶液の取り扱い易さなどの点から、好ましくは約0.1%から約30%、溶解度などを考慮すると、さらに好ましくは、約0.1%から約20%である。使用する酵素の量は、反応時間、基質の濃度との関係で決定され、通常は、約1時間から約48時間で反応が終了するように酵素量を選ぶのが好ましい。基質1gあたり、通常約500~約100,000単位、好ましくは約700~約25,000単位、より好ましくは約2,000~約20,000単位である。

【0071】酵素がCGTaseである場合、反応時のpHは、通常約4から約11である。反応速度、効率、酵素の安定性などの点から、好ましくは約4.5から約

10、さらに好ましくは約5から約8である。反応温度は、約20℃から約110℃、反応速度、効率、酵素の安定性などの点から、好ましくは約40℃から約90℃である。基質濃度は、通常約0.1%から約50%程度、反応速度、効率、基質溶液の取り扱い易さなどの点から、好ましくは、約0.1%から約30%程度である。使用する酵素量は、基質1gあたり、通常約1から約10,000単位、好ましくは約1から約1,000単位、より好ましくは約1から約500単位である。

【0072】なお、各酵素の単位の決定法は、実施例で述べる。

【0073】(生成物の単離、精製)上記反応で得られた種々の環状構造を有するグルカンは、当業者に周知の分離方法、例えば、クロマト分離(例えば、ゲル濾過クロマトグラフィー、HPLC)膜分離等で分離され、溶媒(例えば、メタノール、エタノール)を用いる沈澱等の方法を、単独で、あるいは組み合わせて用いて精製され得る。

【0074】本願発明の方法で、原料の澱粉からの本願グルカンの収率は非常に高く、特に、枝作り酵素を用いた場合にはほぼ100%である。D酵素、あるいはCGTaseを用いる場合には、環状構造のみを有するグルカンも生産されるが、これらは、例えば、セファデックスを用いるゲル濾過により、容易に、目的の分岐構造を有する環状グルカンから分離され得る。

【0075】また、分離された環状グルカンは、HPLC等のゲル濾過で分子量に応じて分離され得る。

【0076】(反応生成物)本願発明の方法で製造されるグルカンは、内分岐環状構造部分と外分岐構造部分とを有し、重合度が50以上の、環状構造を有するグルカンである。重合度は、好ましくは約50~約10,000、より好ましくは約50~約7,000最も好ましくは、約50~約5,000である。

【0077】本願発明の方法により製造されるグルカンに存在する、上記内分岐環状構造における重合度は、好ましくは、約10~約500、さらに好ましくは、約10~約100である。

【0078】本願発明の方法により製造されるグルカンに存在する、上記内分岐環状構造部分の $\alpha-1, 6$ -グルコシド結合は少なくとも1個あればよく、通常1個~約200、好ましくは、約1~約50個である。

【0079】反応生成物の重合度は、ゲル濾過によって、重合度既知のアミロースの溶出位置から示差屈折計を用いて測定され得る。さらに、示差屈折計と低角度レーザー光散乱光度計を併用して、次の原理により重合度が決定され得る。示差屈折計の出力はグルカンの濃度に比例し、低角度レーザー光散乱計の出力はグルカンの重合度と濃度の積に比例する。従って、両検出器の出力の比を測定することにより、グルカンの重合度が決定され得る。

【0080】(環状構造を有することの確認)本願発明の製造方法により得られるグルカンが、内分岐環状構造を有することの確認は、エキソ型のグルコアミラーゼを用いて行い得る。

【0081】エキソ型グルコアミラーゼは、澱粉などのグルカンの非還元末端から順次 $\alpha-1$, 4-グルコシド結合を加水分解する酵素である。速度は遅いが、非還元末端から $\alpha-1$, 6-グルコシド結合を加水分解し得ることが知られている。図8に示したように、環状構造を有しないアミロースおよびアミロペクチンは、エキソ型グルコアミラーゼにより完全にグルコース27にまで分解される。しかし、分子内に環状構造を有するグルカン25および23は、その非環状構造部分のみがグルコアミラーゼにより分解され、環状構造部分は、グルコアミラーゼでは分解を受けない物質(以下、グルコアミラーゼ耐性成分という)として残る。

【0082】このグルコアミラーゼ耐性成分(環状構造部分)が、内分岐構造を有するか否かは、 $\alpha-1$, 6-結合を切断する枝切り酵素に対する感受性によって決定することができる。

【0083】内分岐環状構造($\alpha-1$, 6-グルコシド結合)を有する環状グルカン26は、枝きり酵素とグルコアミラーゼの併用で、グルコース27にまで完全に分解される。

【0084】他方、内分岐環状構造を有しない($\alpha-1$, 4-グルコシド結合のみを有する)環状構造のグルカン23は、枝切り酵素およびエキソ型グルコアミラーゼの併用によって分解されない。この環状グルカン23は、エンド型 α -アミラーゼとグルコアミラーゼを併用することにより完全にグルコースまで分解され得る。

【0085】これらの性質を利用することにより、グルカンの内分岐環状構造部分、外分岐(非環状)構造部分、および $\alpha-1$, 4-グルコシド結合のみを有する環状構造部分を定量することが可能となる。

【0086】本願発明で製造されるグルカンが、内分岐環状構造を有していることは、以下のからの性質で確認され得る。

【0087】還元性末端数は、原料(澱粉など)と比較して増加しない。すなわち、還元末端を検出することができない。上記還元末端数の定量は、Hizukuriら、Carbohydr. Res. 94:205-213(1981)の改変パークジョンソン法により行い得る。

【0088】エキソ型アミラーゼであるグルコアミラーゼを作用させると、グルコアミラーゼ耐性成分が残る。その成分は脱リン酸化酵素(シグマ社)を作用させた後にさらにグルコアミラーゼを作用させても分解されない。

【0089】上記グルコアミラーゼ耐性成分は、澱粉中の $\alpha-1$, 6-グルコシド結合を加水分解するイソアミラーゼ(株式会社林原生化学研究所製)により分解さ

れ、グルコアミラーゼの作用を受けるようになる。

【0090】上記グルコアミラーゼ耐性成分は、澱粉中の $\alpha-1$, 4-グルコシド結合を加水分解するエンド型 α -アミラーゼ(ナガセ生化学工業株式会社製)により分解され、グルコアミラーゼの作用を受けるようになる。

【0091】のエンド型 α -アミラーゼによる加水分解により、イソマルトシルマルトース(IMM)を生じる。 $\alpha-1$, 6-グルコシド結合を有するグルカンにエンド型 α -アミラーゼを作用させた場合の最小のリミットデキストリンは、IMMである(Yamamoto, T. Handbook of amylase and related enzymes, Pergamon Press, p40-45(1988))との記載と一致する。

【0092】上記グルコアミラーゼ耐性成分の分子量をレーザーイオン化TOF-MS装置(島津社製)で分析すると、得られた分子量の値は、環状グルカンの理論値に一致し、非環状のグルカンの理論値に一致しない。

【0093】内分岐環状構造部分の確認のために用いる、前記グルコアミラーゼ耐性成分の検出は、次のように行い得る。例えば、上記反応で生成したグルカンにグルコアミラーゼを添加し、例えば、約40℃で一夜反応させる。この反応物を100℃で10分間加熱し、不溶物を遠心分離により除去した後、10倍量のエタノールを添加し、残存する多糖を遠心分離による沈澱として回収する。この操作をもう一度繰り返して、グルコアミラーゼ耐性成分を得る。ただし、2回目のグルコアミラーゼの処理時間は、短時間(例えば、1から2時間)で十分である。

【0094】本願発明で使用する原料が一部リン酸基により修飾されている澱粉などの場合には、グルコアミラーゼ耐性成分の検出には前処理が必要である。例えば、反応生成物を10mM 炭酸緩衝液(pH9.4、10mMのMgCl₂および0.3mMのZnCl₂を含む)に溶解し、脱リン酸化酵素を添加して反応させた後、10倍量エタノールを添加し、沈澱を回収する。この沈澱に上記の方法を適用して、グルコアミラーゼ耐性成分を得ることができる。

【0095】グルコアミラーゼ耐性成分の重合度および構成成分は、上記からに記載のように、グルコアミラーゼ耐性成分と糖の加水分解酵素とを反応させて生じた糖を分析することによって、決定し得る。加水分解は、グルコアミラーゼ単独、グルコアミラーゼとイソアミラーゼとの組み合わせ、あるいはグルコアミラーゼと α -アミラーゼとの組み合わせが挙げられる。反応は、例えば、グルコアミラーゼ耐性成分を0.2%(w/v)となるように蒸留水に溶解後、上記分解酵素をそれぞれ適当量加えて、30-45℃で適当な時間(例えば1時間)反応させる。このグルコアミラーゼ耐性成分分解物を、Dionex社製の糖分析システム(送液システム:DX300、検出器:PAD-2、カラム:Ca

rb o Pac PA100) にか、分析する。溶出は、例えば、流速：1 ml/分、NaOH濃度：150 mM、酢酸ナトリウム濃度：0分-50 mM、2分-50 mM、37分-350 mM、45分-850 mM、47分-850 mMの条件で行う。この分析により、グルコアミラーゼ耐性成分の重合度、および分解により生じる糖が決定され得る。

【0096】(重合度の調整) 本願発明の方法で得られる内分岐環状構造部分と外分岐構造部分とを有するグルカンの重合度も調整し得る。例えば、得られたグルカンにエキソ型のアミラーゼ、例えばグルコアミラーゼを作用させて、外分岐構造部分の糖鎖を切断し、重合度がより低いグルカンにし得る。この方法も、本願発明に含まれる。

【0097】(本願発明のグルカンの用途等) 本願発明のグルカンおよび本願発明で得られるグルカンは、種々の澱粉の用途に使用され得、特に、飲食用組成物、食品添加用組成物、輸液、接着用組成物、および澱粉の老化防止剤として、使用され得る。これら用途において、本願発明のグルカンは、それぞれの用途に適した濃度となるように使用され得る。

【0098】以下に実施例をあげて本願発明を説明するが、本願発明はこの実施例にのみ限定されるものではない。

【0099】

【実施例】

A 使用する酵素の調製および酵素活性の測定

A-1：枝作り酵素の調製：馬鈴薯からの精製および酵素活性の測定

馬鈴薯塊茎を5 mMの2-メルカプトエタノールを含む適当な緩衝液中でホモジナイズし、遠心分離して、孔径0.45 μmの膜を通した後、Q-セファロースカラム(上述)にか、5 mMの2-メルカプトエタノールを含む20 mM Tris-HCl (pH 7.5) (緩衝液D) に150 mM NaClを含む緩衝液Eで洗浄する。そして、緩衝液Dに450 mMのNaClを含む緩衝液Fで枝作り酵素を溶出する。これを透析し、500 mMの硫酸アンモニウムを含むフェニルトヨパール650 M (Tosoh製) カラムにか、緩衝液D中の硫酸アンモニウム濃度を500 mMから0 mMに変化させることにより溶出を行い、枝作り酵素画分を集め、緩衝液Dに対して透析を行う。透析内液を緩衝液Dで平衡化したPL-SAXカラム(Polymer Laboratory製(U.K.)) にか、緩衝液D中のNaCl濃度を150 mMから400 mMに変化させることにより溶出させて、枝作り酵素画分を集めた。

【0100】酵素活性は、5 mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.05% (w/v) アミロース、および酵素を含む100 μlの反応液を30℃、30分間反応させた後、ヨウ素溶液(1 mg/ml KI, 0.

1 mg/ml I₂, 3.8 mM HClを含む) 2 mlを添加して反応を停止し、波長660 nmにおける吸光度測定して、定量した。1分間に吸光度を1%低下させる酵素量を1単位とした。

【0101】A-2：枝作り酵素の調製-2 大腸菌からの組換え枝作り酵素の精製
バチルス ステアロサーモフィラス (*Bacillus stearothermophilus*) TRBE14株(工業技術院生命工学工業技術研究所：受託番号FERM P-13916) を、枝作り酵素遺伝子の供与体として用いた。

【0102】バチルス ステアロサーモフィラス TRBE14株を、100 mlのL培地を含む500 mlフラスコ中で、一夜、50℃で培養した。培養終了後、遠心分離して菌体を集めた。この集めた菌体から染色体DNAをフェノール法(斎藤、三浦、*Biochimica et Biophysica Acta*, 72, 619 (1963)) により調製した。得られた染色体DNAを、制限酵素Sau3AIを用いて部分分解した後、NaCl密度勾配遠心にか、10 kb以上のDNA断片を集めた。得られた10 kb以上のDNA断片と、BamHIで予め切断したλ-EMBL3ベクター(ストラタジーン社製)とを、T4 DNAリガーゼを用いて連結した。インビトロパッケージングキット(ストラタジーン社製)を用いて、この連結したDNAを含む組換えλ-ファージ懸濁液を作製した。

【0103】大腸菌P2392を、10 mMのMgCl₂を加えたNZY培地(1% NZアミン、0.5% イーストエキス、0.5% NaCl)で37℃、一夜、振とう培養した。培養終了後、集菌し、10 mMのMgCl₂ 10 mlに懸濁して、組換えλ-ファージ懸濁液と混合した。混合液を37℃で20分間保温した後、NZY寒天培地に重層し、37℃で一晩保温して、溶菌斑が点在するプレートを得た。

【0104】この組換えλ-ファージの中から、目的の遺伝子を持つファージを選択するためのプローブを作製した。数種の枝作り酵素のアミノ酸配列中には、α-アミラーゼなどに既に見出されている4つの保存領域(保存領域1、2、3、および4)が存在することが知られている(*J. Biol. Chem.*, 267, 18447 (1992年))。図9に示す保存領域1の配列に対応する配列(5' GAYTG GGTNCCNGSNCA YTTY 3'；配列番号：1)および4付近の配列に対応する配列(WSNGTRCTRCTYCANCANGTR；配列番号：2)に対応する2種のDNAプライマーを合成した。この合成プライマーと上記で得られた10 kb以上の染色体DNAとを、Tth DNAポリメラーゼ(東洋紡(株)製)を用いて反応させ、上記の2つの合成プライマーにはさまれる領域のDNA断片を増幅した。反応は、94℃、1分；45℃、1分；72℃、1分を1サイクルとして、30サイクル繰り返した。増幅されたDNA断片は、約560 bpであった。この増幅したDNA断片を、制限

酵素Sma Iで処理したpUC19に連結し、組換えプラスミドpTBE3を得た。この得られた組換えプラスミドpTBE3から、マルチプライム法DNAラベリングキット（ファルマシア社製）を用いて、放射能ラベルされた枝作り酵素遺伝子の単離のためのプローブを作製した。

【0105】上記で作製した組換えλ-ファージの溶菌斑が点在するプレートにナイロンフィルター（アマシヤム社製）を密着させ、アルカリ処理して、溶菌斑中の組換えλ-ファージDNAを変性させ、フィルターに固定した。このフィルターを上記で作製した放射能ラベルしたプローブの溶液に浸し、65℃で16時間、ハイブリダイゼーションを行った。フィルターをよく洗い、乾燥後、X線フィルムに密着させ、枝作り酵素遺伝子を含む組換えλ-ファージを選択した。この得られた組換えλ-ファージをλ-TBE102と命名した。λ-TBE102の制限酵素地図を、図10に示した。

【0106】枝作り酵素の遺伝子を含むプラスミドは、図11に示す方法で作製した。まず、λ-TBE102からDNA断片を回収し、Sal Iで切断し、アガロースゲル電気泳動した。常法により、DNAをニトロセルロースフィルターに移動させ、上記プローブを用いて、65℃、16時間ハイブリダイズさせた。Sal Iの4Kbの断片がハイブリダイズした。この4kb Sal I断片を単離し、pBR322のSal I部位に組み込んで、pTBE31を作製した。

【0107】次に、pTBE31から1.4kbのSal I-EcoRI断片を単離し、Sal I-EcoRI処理したプラスミドpUC118に連結して、pUC118SEを作製した。pUC118SEをEcoRIで切断し、T4DNAポリメラーゼで切断部位を平滑末端とし、HindIIIリンカーを導入して、pUC118SEHを作製した。

【0108】他方、上記4kb Sal I断片を含む約5kbのXho I DNA断片をpBR322のSal I部位に導入し、pTBE51を作製した。このpTBE51から、Sal I-Aor51HIDNA断片を切り出し、Sma I-Sal Iで切断したpUC118に連結し、pUC118ASを作製した。

【0109】このpUC118ASから、約1kbのBamHI-Sal I DNA断片を単離し、BamHI-Sal I処理したpUC118SEHに連結して、pTBE821を得た。このプラスミドpTBE821は、枝作り酵素のアミノ酸配列をコードしていた（配列番号：3）。

【0110】このプラスミドpTBE821を常法に従い、大腸菌TG-1に形質転換した。

【0111】プラスミドpTBE821で形質転換された大腸菌TG-1株を培養し、遠心分離（8,000rpm, 5分）して菌体を得た。この菌体を、5mMの2-

メルカプトエタノールを含む50mMのTris-HCl（pH7.0）（緩衝液A）に懸濁し、超音波により細胞を破壊した。そして、遠心分離（12,000rpm, 10分）により不溶物を除き、60℃で15分間加熱し、遠心分離（12,000rpm, 10分）により変性したタンパク質などを沈澱として除いた。得られた上清を緩衝液Aに対して透析した後、Q-Sepharoseカラム（ファルマシア製）にかけ、5mMの2-メルカプトエタノールを含む50mM Tris-HCl（pH7.0）（緩衝液A）に100mM NaClを含む緩衝液Bで洗浄した。そして、緩衝液Aに200mMのNaClを含む緩衝液Cで枝作り酵素を溶出した。これに終濃度170mMになるように硫酸アンモニウムを添加し、これをフェニルトヨパール650M（Tosoh製）カラムにかけ、緩衝液Aにより枝作り酵素を溶出させ、枝作り酵素を得た。

【0112】酵素活性の測定は、反応温度を50℃にする以外は、馬鈴薯枝作り酵素の場合と同様に行った。

【0113】A-3：D酵素の調製および活性の測定
Takahaら J.Biol.Chem.vol.268.1391-1396(1993)に記載されている方法でD酵素を精製した。まず、馬鈴薯塊茎を5mMの2-メルカプトエタノールを含む20mM Tris-HCl（pH7.5）緩衝液（緩衝液A）中でホモジナイズし、遠心分離して、0.4μmのメンブレンを通した後、Q-Sepharoseカラム（16X100mmファルマシア）にかけ、150mM NaClを含む緩衝液Aで洗浄した。D酵素は、450mMのNaClを含む緩衝液Aに溶出した。溶出後、緩衝液Aに対して透析し、最終濃度が500mMとなるように硫酸アンモニウムを加えた。この溶液をPhenyl Toyopearl 650M（Toso）カラム（10X100mm）にロードし、緩衝液A中の硫酸アンモニウム濃度を500mMから0mMに変化させることにより溶出を行った。D酵素活性画分を集め、緩衝液Aに対して透析を行い、透析液をAmicon Centricon 30マイクロコンセンレーターを用いて濃縮し、PL-SAXHP1Cカラム（Polymer Laboratory U.K）にかけ、緩衝液A中150-400mMのNaCl直線濃度勾配をかけて溶出し、活性画分を集めて上記Amicon Centricon 30マイクロコンセンレーターで濃縮した。

【0114】酵素活性の測定は、100mM Tris-HCl（pH7.0）、5mM 2-メルカプトエタノール、1%（W/V）マルトトリオース、および酵素を含む100μlの反応混合液を37℃、10分間、反応させ、反応液を沸騰水中で3分間加熱して、反応を停止し、反応により遊離したグルコースをグルコースオキシダーゼを用いる方法（Barham et al., (1972) Analyst 97:142）により定量した。1分間に1μmolのグルコ

ースを生じる酵素量を1単位とした。

【0115】A-4: CGTaseの調製

Alkalophilic Bacillus sp. A2-5a (以下、A2-5a株という)由来のCGTaseを用いた。このCGTaseの生産株Alkalophilic Bacillus sp. A2-5aは、特開平7-107972号にその性質等が開示されており、出願人によって、工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号(FERM P-13864)として寄託されている。

【0116】A2-5a株由来CGTaseの精製方法は以下の通りである。A2-5a株をAL液体培地(1%可溶性澱粉、4%コーンスティブリカー、0.1% K_2HPO_4 、0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、1% Na_2CO_3 、pH=10.0)で、33℃、24時間培養後、遠心分離して培養液から菌体を除去した培養上清を集めた。この培養上清1.6Lにデンプン20gを添加し、4℃で16時間攪はんし、CGTaseをデンプン粒子に吸着させた。これをカラムにつめ、カラムを100mlの22.8%硫酸アンモニウム溶液で5回洗浄後、100mlの33mM Na_2HPO_4 でCGTaseを5回溶出させた。この溶出液に終濃度で57%となるように硫酸アンモニウムを添加し、生じた沈澱を回収後、20mM Tris-塩酸バッファー(pH7.5)に対し透析した。この溶液全量を20mM Tris-塩酸バッファー(pH7.5)で平衡化したQ-セファロースカラム(8ml)にロードし、0.4M NaClを含む同緩衝液50mlで洗浄した後、同緩衝液中のNaCl濃度を0.4Mから1Mに変化させることによりCGTaseを溶出した。活性画分を集めてA2-5a株由来の精製CGTaseを得た。

【0117】A-5: 固定化CGTaseの調製

蒸留水で洗浄した酵素固定化用担体キットパールBCW-3503(富士紡績(株))1gと、20mMの酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.5)を含むCGTase酵素液100単位(5ml)を室温で2時間緩やかに攪はんしながらインキュベートし、CGTaseを担体に吸着させた。この懸濁液をろ過してから、ろ液のCGTase活性を測定したところ、CGTase活性はほとんど検出されなかったため、大部分のCGTaseは担体に結合したものと考えられた。このCGTase結合担体を、反応に使用した。

【0118】なお、CGTaseの活性は、1.5%可溶性澱粉溶液(20mM酢酸ナトリウムバッファーでpH5.5に調整)をあらかじめ40℃に設定した恒温槽にいれ、次いで、この溶液にCGTaseを加えて反応を開始させる。10分間の反応の後、この反応溶液(0.25ml)に0.5mlの0.5N酢酸-0.5NHC1(5:1、v/v)溶液を添加し反応を停止させる。この反応液0.1mlをとり、0.005% I_2 および0.05%KIを含有する溶液を加え、攪はんし

室温に20分間放置する。この溶液の660nmにおける吸光度を測定する。このときCGTaseを添加しないものをブランクとして調製し、同様の操作を行う。この条件下、1分間に10%の660nmにおける吸光度の減少を生じる酵素量を1単位とした。

【0119】B. 枝作り酵素を用いるグルカンの製造

(実施例1:グルカンの調製)市販のワキシコーンスターチ(平均重合度30,000以上)5gを40mlの5mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.5)に懸濁し、100℃の湯浴中で糊化させて、約50℃まで放冷した。この糊液に、組み換え法で精製した枝作り酵素2000単位を添加し、50℃で6時間反応させた。

【0120】この反応液を100℃で20分間加熱し、遠心分離(10,000rpm,15分)により変性した酵素タンパク質を除いた。上清に2倍量のエタノールを添加し、沈澱させた。この沈澱を凍結乾燥し、粉末のグルカン約4.8gを得た。

【0121】(実施例2:重合度の測定)示差屈折計と低角度レーザー光散乱光度計を併用して、ゲルクロマトグラフィーを行い、重合度を測定した。上記反応で得られたグルカンを0.6%(W/V)となるように、1.5%アセトニトリルおよび0.02%アジ化ナトリウムを含む0.1Mリン酸緩衝液(pH6.2)に溶解した。この溶液200 μ lをAsahipak GS520、Asahipak GS320(いずれも旭化成製)、およびTSK-G2000PW(東ソー製)を連結したカラムにかけた。

【0122】溶出パターンを図12に示す。図12に示したように、製造されたグルカンの重合度は、約50~5,000の範囲にあり、ピークSおよびLはそれぞれ、460および770であった。重量平均重合度は900であった。

【0123】(実施例3:実施例1で得られたグルカンの構造決定)

3-1:還元性末端の定量

実施例1で得られたグルカンの還元性末端の定量を、Hizukuriらの改変パークジョンソン法により行った。原料であるワキシコーンスターチと比較し、還元性末端数の増加は検出できなかった。還元性末端を増加させることなく、原料を低分子化するには環状化反応しかないことから、これらのグルカンは、少なくとも1個の α -1,6-グルコシド結合を持つ環状構造を分子内に1つ有すると思われる。

【0124】3-2:グルコアミラーゼ耐性成分の取得

エキソ型グルコアミラーゼ耐性成分の検出を以下のように行った。実施例1で得られたグルカン500mgを500 μ lのDMSOに完全に溶解させた。このグルカン溶液に、1M酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.5)500 μ l、蒸留水3mlおよび、50単位/mlのグルコアミラーゼ(1ml)を添加し、40℃で3時間反応さ

せた。この反応物を100℃で10分間加熱し、不溶物を遠心分離(10,000rpm、15分)により除去した。上清に10倍量のエタノールを添加し、遠心分離(10,000rpm、15min)して沈殿を回収した。得られた沈殿を乾燥後、1mlの蒸留水に溶解した。この溶解液に再度50単位/μlのグルコアミラーゼを添加し、40℃で3時間反応させた。100℃で10分間加熱し、不溶物を遠心分離(10,000rpm、15分)により除去した。上清に10倍量エタノールを添加し、遠心分離して沈殿を回収した。得られた沈殿を乾燥し、粉末のグルコアミラーゼ耐性成分13mgを得た。このことから、実施例1で得られたグルカンは、環状構造を有していることが示唆された。

【0125】3-3: グルコアミラーゼ耐性成分の重合度測定

得られたグルコアミラーゼ耐性成分を、示差屈折計と低角度レーザー光散乱計を併用したゲル透過クロマトグラフィーに供することにより、その平均重合度を求めると49であった。この値は、分解前の平均重合度900よりも小さくなっており、グルコアミラーゼで分解される外分岐構造部分が存在していることを示唆する。このグルコアミラーゼ耐性成分の中から、ゲル透過クロマトグラフィーを用いて、低分子部分を取得した。これを島津社製レーザーイオン化TOF-MS装置Compact Ma1diに供し、分子量測定を行った。図13に示したように、10数本のピークが観察された。それらの分子量は、重合度が1つ異なる環状構造を有するグルカんにナトリウムイオンが付加した物質の理論値によく一致した。その誤差は、装置の誤差範囲内(±0.2%)であった。環状構造を有しないグルカンの理論値には一致しなかった。図13において、最も小さいピークの分子量は2455であり、これは、重合度15の環状グルカんに、ナトリウムイオンが付加したものの分子量と一致する。このほか、重合度16~36の環状グルカんにナトリウムイオンが付加したピークが検出された。

【0126】3-4: グルコアミラーゼ耐性成分の各種糖質分解酵素による消化
上記のようにして得られたグルコアミラーゼ耐性成分を0.4%(w/v)になるように蒸留水に溶解後、50μlとり、図14に示した糖質分解酵素をそれぞれ図14に示した濃度になるように加えて60μlとし、40℃で一晩反応させた。この反応液を100℃で5分加熱後、変性したタンパク質を遠心分離(12,000rpm、5分)により除き、反応物を、Dionex社製の糖分析システムにかけた。条件は上記と同じである。

【0127】このグルコアミラーゼ耐性成分は、図14に示されるように、グルコアミラーゼ単独によっては分解されなかったが、澱粉分子内部のα-1,4-グルコシド結合を加水分解するエンド型アミラーゼであるα-アミラーゼ(ナガセ生化学工業株式会社製)により分解

され、IMMが検出された。また澱粉中のα-1,6-グルコシド結合を加水分解するイソアミラーゼ(林原生物化学研究所製)とグルコアミラーゼとの併用により分解された。また、図14に示されるように、グルコアミラーゼ耐性成分は、イソアミラーゼ単独で一部分解され、重合度3以上のオリゴ糖を生成した。

【0128】以上のことから、得られたグルコアミラーゼ耐性成分は、環状のグルカンであること、および、少なくとも1個のα-1,6-グルコシド結合を含むものであることがわかった。

【0129】35: 実施例1で得られたグルカンの構造
実施例1のグルカン中に外分岐構造が存在することの証明として、グルコアミラーゼ耐性成分中にグルコシルスタップが存在することを確認した。ここで、グルコシルスタップとは、グルコアミラーゼで処理したときに残る、外分岐構造部分と環状構造との結合部分のグルコース残基をいう。Hizukuriら(1978) Carbohydr. Res: 63: 261-264の迅速スミス分解法により、グルコアミラーゼ耐性成分の非還元末端を定量することにより、グルコアミラーゼ耐性成分の全グルコシル基の19%が、環状構造に結合したグルコシルスタップであることがわかった。従って、グルコアミラーゼ耐性成分の平均重合度49のうち約9個のグルコースは、外分岐構造より由来したグルコシルスタップであり、残り約40個のグルコースが、内分岐環状構造を形成していると考えられた。以上のことから、実施例1のグルカンは、内分岐環状構造に加えて複数個の外分岐構造部分を有することがわかった。

【0130】以上から、本願発明の方法で製造されたグルカンは、外分岐構造部分と内分岐環状構造部分とを有すること、および、重合度が約50以上であることがわかった。また、本願発明の方法で製造されたグルカンは、全体の平均重合度が約900、内分岐構造部分の平均重合度が約40であったことから、外分岐構造部分の重合度は約860であると推測された。従って、枝作り酵素により生産された本願発明のグルカンは、平均的には内分岐環状構造部分と外分岐構造部分とを約1:20の割合で含んでいることを示唆している。

【0131】(実施例4: 環状グルカンの重合度の調節)
実施例1で得られたグルカン500mg(平均重合度900)を、500μlのDMSOに完全に溶解させた。これに1M酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.5)500μl、蒸留水3ml、および10単位/mlのエキソ型グルコアミラーゼ(東洋紡(株)製)1mlを添加して、40℃、3時間反応させた。100℃、10分間加熱した後、変性した酵素タンパクを遠心分離(10,000rpm、15分)して除いた。上清のグルコース量を、グルコスタット法により定量した。実施例1で得られたグルカン中のグルコシル残基のうち、約70%が切除されたことがわかった。この上清に、10倍量のエ

タノールを添加することにより、グルカンを沈澱させ、外分岐構造部分が短くなったグルカンを得た。得られたグルカンの平均重合度は270であった。

【0132】C. D酵素を用いる製造方法 (実施例5)

5-1: D酵素を用いる製造

市販のワキシコーンスターチ40mgを2mlのDM SOに懸濁した。この懸濁液に、精製したD酵素680単位を含む20mM クエン酸緩衝液(pH7.0)18mlを添加し、30℃で40時間反応させた。

【0133】反応液を100℃で10分間加熱した後、遠心分離して、変性した酵素タンパクを除去した。上清に10倍量のエタノールを添加し、グルカンを沈澱させた。次いで、得られた沈澱を凍結乾燥し、グルカンの粉末約40mgを得た。

【0134】得られた沈澱をゲル滲透クロマトグラフィーで分画した。沈澱を250 μ lの蒸留水に溶解し、Superose 6(ϕ 1cm \times 30cm、ファルマシア製)とSuperdex 30(ϕ 1cm \times 30cm、ファルマシア製)とを連結したカラムにその全量をロードした。次いで、150mM酢酸ナトリウム水溶液を用いて流速1ml/分で溶出を行った。図15に示すように、ボイドボリュームに溶出されていたアミロペクチンはD酵素の反応により低分子化され、平均分子量が約30,000であるピークIおよび平均分子量が約3,000であるピークIIの2種類の成分が生成した。なお、環状グルカンの分子量は、酵素合成アミロースをスタンダードとして用いて算出した値である。

【0135】ピークIおよびIIの画分をそれぞれ分取した。ピークIの画分に10倍量のエタノールを加えてグルカンを沈澱させた。沈澱を遠心分離して回収後、凍結乾燥して、20mgのグルカンを得た。同様に、ピークIIから沈澱を回収し、凍結乾燥して、5mgを得た。

【0136】この分離したピークIおよびIIの構造を解析した。

【0137】5-2: ピークIの構造解析

ピークIのグルカンの還元性末端は、検出されず、還元末端数も原料であるワキシコーンスターチと比較して、増加しなかった。

【0138】ピークIのグルカンを、実施例3の3-2と同様の条件で、グルコアミラーゼ処理したところ、グルコアミラーゼ耐性成分が得られた。このグルコアミラーゼ耐性成分の平均分子量は上記と同様、酵素合成アミロースをスタンダードとして用いて算出した値で、約5,000であり、グルコアミラーゼ処理前と比較して小さくなっていることも認められた。

【0139】さらに、得られたグルコアミラーゼ耐性成分を実施例3:3-4と同じ方法で各種糖質分解酵素により消化した結果、グルコアミラーゼ単独によっては分解

されなかったが、澱粉分子内部の α -1, 4-グルコシド結合を加水分解するエンド型アミラーゼである α -アミラーゼにより分解され、IMMが検出された。また澱粉中の α -1, 6-グルコシド結合を加水分解するイソアミラーゼとグルコアミラーゼとの併用により分解された。また、グルコアミラーゼ耐性成分は、イソアミラーゼ単独で一部分解され、重合度3以上のオリゴ糖を生成した。

【0140】以上のことから、得られたグルコアミラーゼ耐性成分は、少なくとも1個の α -1, 6-グルコシド結合を含む環状構造であることがわかった。

【0141】さらに、グルコアミラーゼ耐性成分中に、グルコシルスタップが存在することを確認した。従って、ピークIのグルカンは内分岐環状構造部分と外分岐構造部分とを有するグルカンであると結論した。

【0142】5-3: ピークIIの構造解析

ピークIIのグルカンは、還元性末端が検出されなかった。ピークIIの大部分のグルカンをグルコアミラーゼで処理しても分子量が減少しなかった。ピークIIのグルカンはエンド型アミラーゼである α -アミラーゼにより完全に分解され、IMMがほとんど検出されなかった。さらに、 α -1, 6-グルコシド結合を切断するイソアミラーゼで大部分が分解されなかった。

【0143】これらのことから、ピークIIは、 α -1, 6-グルコシド結合を含まず、かつ外分岐構造を有しない、および α -1, 4-グルコシド結合のみを有する環状グルカンを主成分とすると結論した。

【0144】5-4: 実施例5で得られたグルカン

従って、実施例5で得られたグルカンは、 α -1, 4-グルコシド結合のみを有するグルカンと、内分岐環状構造部分と外分岐構造部分とを有するグルカンとの混合物であると結論した。

【0145】(実施例6: 実施例5のピークIのグルカンの構造) ピークIは、内分岐環状構造部分と外分岐構造部分とを有するグルカンであることが確認された。このうち、外分岐構造部分は、グルコアミラーゼにより完全にグルコースにまで分解され、内分岐環状構造部分(グルコアミラーゼ耐性成分)が残る。さらにこのグルコアミラーゼ耐性成分は、枝切り酵素とグルコアミラーゼの併用によって分解される。これらの性質を利用して、グルカン中の非環状構造部分、 α -1, 6-結合を含む環状構造部分及び α -1, 6-結合を含まない環状構造部分を定量することが可能となる。

【0146】実施例5で得られたピークIを10mg、およびアミロペクチン10mgを、それぞれ、1mlのDM SOに溶解し、直ちに、8mlの100mMの酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.0)を加えて希釈した。この希釈液を900 μ lずつ4本のチューブに分注した。ついで、それぞれのチューブに(1)蒸留水、(2)グルコアミラーゼ液、(3)枝切り酵素とグルコアミラー

ゼとの混合液、および(4)エンド型 α -アミラーゼとグルコアミラーゼとの混合液を100 μ l加えて、40℃、4時間反応させた。反応終了後、生成したグルコースの量を、市販のグルコース定量キットを用いて測定した。そして、試料グルカン中の外分岐構造部分、内分岐

環状構造部分および α -1, 4-グルコシド結合のみを有する環状構造部分をそれぞれ以下の式により求めた。

【0147】

【数1】

【0148】ここで、c、x、yおよびzは、それぞれ、上記(1)、(2)、(3)および(4)の反応液から生じたグルコース量である。結果を表1に示す。

【0149】

【表1】

【0150】この結果は、実施例5で得られたピークIのグルカンが、少なくとも1個の α -1, 6-グルコシド結合を含んでいること、および、平均的には、内分岐環状構造部分と外分岐構造部分とを約1:7の割合で含んでいることを示唆している。

【0151】D. CGTaseを用いるグルカンの製造(実施例7:CGTaseを用いるグルカンの製造方法)原料として市販のワキシコーンスターチ40mgを、18mlの100mMNaClを含む20mM酢酸ナトリウム緩衝液(PH5.5)に加熱溶解した。他方、精製したCGTaseを0.2単位/mlとなるように、100mMNaClを含む20mM酢酸ナトリウ

ム緩衝液(PH5.5)に溶解した。この酵素溶液2mlを上記原料の溶解液に添加し、40℃で2時間反応させた。

【0152】反応液を100℃で10分間加熱したのち、遠心分離により変性した酵素タンパクを除いた。上清に10倍量のアセトンを添加し、グルカンを沈澱させた。

【0153】(実施例8:実施例7で得られたグルカンの構造解析)得られた沈澱をゲルろ過クロマトグラフィーで分析した。沈澱を250 μ lの蒸留水に溶解し、Superose6(ϕ 1cm \times 30cm、ファルマシア製)とSuperdex30(ϕ 1cm \times 30cm、フ

アルマシア製)を連結したカラムにその全量をロードし、100mM NaClを含む20mM酢酸ナトリウム緩衝液(PH5.5)により、流速1ml/分で溶出させた。図16に示したように、ボイドボリュームに溶出されていたアミロペクチンはCGTaseの反応により低分子化され、主として、ピークIIIおよびピークIVの2種類の成分が生成された。これらのピークIIIおよびIVは、分取され、アセトンによる沈澱を経て、回収され、凍結乾燥されて、それぞれ粉末として、16mgおよび13mgを得た。

【0154】ピークIIIの平均分子量は30,000であった。ピークIVは、非常に低分子であり、本法では測定不可能であった。

【0155】8-1 ピークIIIの構造解析
分取したピークIIIの画分に10倍量のエタノールを加えて沈澱を生じさせた。沈澱を遠心分離して回収し、凍結乾燥した。粉末のグルカン16mgを得た。

【0156】ピークIIIのグルカンの還元性末端は、検出されず、還元末端数も原料であるワキシコーンスターチと比較して、増加しなかった。

【0157】ピークIIIのグルカンを、実施例3の3-2と同様の条件で、グルコアミラーゼ処理したところ、グルコアミラーゼ耐性成分が得られた。このグルコアミラーゼ耐性成分の平均分子量は上記と同様、酵素合成アミロースをスタンダードとしたゲル濾過クロマトグラフィーから算出した値で、約5,000であり、グルコアミラーゼ処理前と比較して小さくなっていることも認められた。

【0158】さらに、得られたグルコアミラーゼ耐性成分を上記実施例3:3-4と同じ方法で各種糖質分解酵素により消化した結果、グルコアミラーゼ単独によっては分解されなかったが、澱粉分子内部の α -1,4-グルコシド結合を加水分解するエンド型アミラーゼである α -アミラーゼにより分解され、IMMが検出された。また澱粉中の α -1,6-グルコシド結合を加水分解するイソアミラーゼとグルコアミラーゼとの併用により分解された。また、グルコアミラーゼ耐性成分は、イソアミ

ラーゼ単独で一部分解され、重合度3以上のオリゴ糖を生成した。さらに、グルコアミラーゼ耐性成分中に、グルコシルスタックが存在することを確認した。

【0159】以上のことから、得られたグルコアミラーゼ耐性成分は、少なくとも1個の α -1,6-グルコシド結合を含む環状構造であることがわかった。

【0160】従って、ピークIIIのグルカンは内分岐環状構造部分と外分岐構造部分とを有するグルカンであると結論した。

【0161】8-2 ピークIVの構造解析
ピークIVのグルカンは、還元性末端が検出されなかった。ピークIVのグルカンをグルコアミラーゼで処理しても分子量が減少しなかった。ピークIVのグルカンは α -1,6-グルコシド結合を切断するイソアミラーゼで分解されなかった。これらのことから、ピークIVは、 α -1,6-グルコシド結合を含まず、かつ外分岐構造を有しない、および α -1,4-グルコシド結合のみを有する環状構造であると結論した。

【0162】他方で、ピークIVのグルカンを、アミノカラムを用いたHPLCにより分析したところ、2本のピークが確認された。それぞれのピークは、重合度が6,7の環状 α -1,4グルカンつまり α -CDおよび β -CDと溶出位置が完全に一致した。従ってピークIVは、従来から知られている α -CDと β -CDの混合物であると結論された。

【0163】8-3: 実施例7で得られたグルカンの構造
以上から、実施例7で得られたグルカンは、 α -1,4-グルコシド結合のみを有する α -CDおよび β -CDと、内分岐環状構造部分と外分岐構造部分とを有するグルカンとの混合物であると結論した。

【0164】(実施例9: 実施例7のピークIIIのグルカンの構造) 実施例6と同様にして、実施例7で得られたピークIIIのグルカンの内分岐環状構造部分、および外分岐構造部分の構造を検討した。結果を表2に示した。

【0165】
【表2】

【0166】この結果は、実施例7で得られたピークIIのグルカンが、実施例5のピークIのグルカンとほぼ同様なグルカンであることを示している。つまり、ピークIIIのグルカンは、少なくとも1個の α -1, 6-グルコシド結合を含んでいること、および、平均的には、内分岐環状構造部分と外分岐構造部分とを約1:7の割合で含んでいることを示唆している。

【0167】以上のことから、枝作り酵素、D酵素、あるいはCTGaseを用いて、内分岐環状構造部分と外分岐構造部分とを有するグルカンを製造し得、かつ、酵素が異なっても、ほぼ同じグルカンが製造され得るこ

が確認された。

【0168】(実施例10: 本願発明の方法で得られたグルカンの溶解性) 実施例1、実施例5のピークI、実施例7のピークIIIのグルカン、比較としてワキシコーンスターチ、および可溶性澱粉(和光純薬製)を、それぞれ10%(w/v)となるように蒸留水に懸濁し、vortexミキサーにて激しく攪拌した後、遠心分離(12,000rpm、10分)し、上清に溶解した糖濃度を測定した。その結果を表3に示す。

【0169】

【表3】

【0170】従来のワキシコーンスターチおよび可溶性澱粉に比べ、本願発明の方法で得られたグルカンの溶解性が顕著に高いことが示された。

【0171】(実施例11: 各実施例で得られたグルカンの老化性) 実施例1、実施例5のピークI、実施例7のピークIIIで得られたグルカン、比較として従来のワキシコーンスターチ、および可溶性澱粉(和光純薬製)を、それぞれ200mgとり、スクリーバイアル

に入れ蒸留水10mlを加えた後、沸騰湯浴中で加熱することにより溶解した。但し、ワキシコーンスターチは溶解性が悪いため、50mgをとり、同様に処理した。これらを4℃に放置し、一定時間後それぞれのサンプル1mlをとり、その660nmにおける濁度を測定し、老化性の指標とした。その結果を表4に示す。

【0172】

【表4】

	660nmにおける濁度の増加	
	1日後	2日後
実施例1のグルカン	0	0
実施例5のピークI	0	0
実施例7のピークIII	0	0
可溶性澱粉	0.182	0.583
ワキシコーンスターチ	0.012	0.023

【0173】従来のワキシコーンスターチおよび可溶性澱粉に比べ、実施例で得られたグルカンの老化性が顕著に低いことが示された。

【0174】（実施例12：実施例で得られたグルカンの糊液の粘性）実施例1、実施例5のピークI、実施例7のピークIIIで得られたグルカン、比較として従来のワキシコーンスターチ、および可溶性澱粉（和光純薬製）、およびパインデックス（Pinedex）#1（松谷化学株式会社製）を、それぞれ1.6gとり、バイアルに入れ、蒸留水8mlを加えて分散させた後、ジメチルスルフォキシド72mlを加え、室温で十分に攪拌することにより溶解した。それぞれの粘度を、Digital Viscometer DVL-B（TOKYO KEIKI製、ローター：No. 1、回転数：60rpm、10秒間測定）により測定した。対象として、蒸留水8mlにジメチルスルフォキシド72mlを加えた溶液（90%DMSO溶液）についても測定した。その結果を表5に示す。なお、ここで用いたパインデックス#1は、上記可溶性澱粉よりも強く酸で加水分解した澱粉である。

【0175】

【表5】

	粘度 (mPa・S)
90%DMSO溶液	5.3
実施例1のグルカン	6.4
実施例5のピークI	6.2
実施例7のピークIII	6.1
パインデックス#1	5.8
可溶性澱粉	5.6
ワキシコーンスターチ	100.3

【0176】従来のワキシコーンスターチ比べて、各実施例で得られたグルカンを溶解した糊液の粘性が顕著に低く、パインデックス#1および可溶性澱粉と同様の粘性を示すことがわかった。

【0177】（実施例13：実施例で得られたグルカンの反応性）実施例1、実施例5のピークI、実施例7のピークIIIで得られたグルカン、比較として従来の可溶性澱粉（和光純薬製）、およびパインデックス（Pinedex）#1（松谷化学株式会社製）を、それぞれ20mgを蒸留水1mlに溶解させ、還元力をジニトロサリチル酸法（福井作蔵著、生物化学実験法1 還元糖の定量法、学会出版センター）により、グルコースを標準として調べた。その結果を表6に示す。

【0178】

【表6】

	還元糖量 (mg/ml)
本願グルカン	検出できず. (<0.01)
実施例5のピークI	検出できず. (<0.01)
実施例7のピークIII	検出できず. (<0.01)
パインデックス#1	5.10
可溶性澱粉	2.84

【0179】従来のパインデックス#1および可溶性澱粉から還元糖が検出されたのに対し、各実施例から得られたグルカンからは、還元糖が検出されなかった。

【0180】着色が生じる糖とアミノ酸との反応（アミノ・カルボニル反応）は、糖の還元基とアミノ酸との反応である（五十嵐修著、食品化学、弘学出版社）。従って、上記各実施例で得られたグルカンは、還元糖の量が少ない（検出されない）、すなわち還元基が少ないことから、従来のパインデックス#1および可溶性澱粉に比べて、反応性が低いということがわかった。

【0181】（実施例14：リン酸化したグルカンの誘導体の調整）実施例1で得られたグルカン8mgをジメチルホルムアミド1ml中に懸濁し、オキシ塩化リン46mgとを反応させ、この反応液にアセトン9mlを加えて、リン酸化したグルカンの誘導体8mgを得た。

【0182】（実施例15：実施例1のグルカンによる

食塩	0.3
ビタミンC	0.02
ビタミンB1ソーダ	0.02
塩化マグネシウム	0.2
乳化カルシウム	0.2
クエン酸	2.0
クエン酸ソーダ	1.5
ブドウ糖	50
水	1000
実施例1の環状グルカン	100

得られたスポーツドリンクは消化性に優れ、エネルギー変換効率の高い飲料であった。

【0186】（実施例17：本願発明のグルカンを含む接着性組成物）実施例5のピークIのグルカン40部の水60部を加え、加熱溶解させた。この溶液は、良好な接着性を示した。

【0187】

【発明の効果】本願発明の方法により、従来用いることが考えられなかった酵素を用いて、本願発明のグルカンが生産され得る。本願発明の製造方法は、原料である α -1, 4-グルコシド結合と α -1, 6-グルコシド結合とを有する糖類と、該糖類に作用して環状構造を形成し得る酵素とを反応させる工程を包含すればよい。従って、非常に容易に、本願発明のグルカンを製造し得る。

る、澱粉の老化抑制効果）完全に加熱糊化した4%可溶性澱粉水溶液を4℃に保存すると、可溶性澱粉は速やかに老化し、糊液は白濁する。この系を用いて本願発明で得られるグルカンの、澱粉老化抑制効果について検討した。実施例1で得られたグルカンをそれぞれ終濃度で、0%、2%、および4%となるように、4%の可溶性澱粉水溶液に添加し、これを4℃に保存した。一定時間にサンプリングを行い、660nmの吸光度で白濁度を測定した。結果を、図17に示す。

【0183】実施例1のグルカンは、澱粉の老化抑制効果を有することが示された。

【0184】（実施例16：本願発明のグルカンを含むスポーツドリンク）実施例1で得られたグルカンを用いて、以下の成分を以下の割合で配合したスポーツドリンクを作製した。なお、単位は重量部である。

【0185】	
	0.3
	0.02
	0.02
	0.2
	0.2
	2.0
	1.5
	50
	1000
	100

【0188】本願発明のグルカンは、既存の澱粉などの上記原料と比較して、水に対する溶解度が非常に高く、溶解した糊液の粘度が低く、また通常の澱粉に観察される老化が起こらないという優れた性質を有する。さらに、本願発明のグルカンまたはその誘導体は、反応性が低いため、タンパク質やアミノ酸と混合して加熱したとき、既存の水飴およびデキストリンと比較して、着色しにくいという優れた性質を有している。

【0189】このように、本願発明のグルカンは、水に対する溶解度が非常に高いため、粉末化基剤、コーヒー、醬油、たれ、麺類のつゆ、ソース、ダシの素、シチューの素、スープの素、複合調味料、カレーの素、ゼリー、キャラメル、ガム、チョコレート、クッキー、クラッカー、アイスクリーム、シャーベット、ジュース、粉

末ジュース、入浴剤、飲み薬、粉末薬、塗料、接着剤、増粘剤、糊料などに、好適に使用され得る。

【0190】本願発明のグルカンは、老化が起こらないため、和生菓子、洋生菓子、冷凍食品、冷蔵食品、餅、おにぎりなどに好適に使用しされ得る。

【0191】本願発明のグルカンまたはその誘導体は、溶解した糊液の粘度が低いため、生物崩壊性プラスチックの原料や、澱粉からサイクロデキストリンなどを製造する際の間物質、澱粉加工工業における原料などに好適に使用され得る。

【0192】また、本願発明のグルカンは、良好な接着性を有し、接着用組成物として好適に使用され得る。

配列：GAYTG GGTNC CNGSN CAYTT Y 21

配列番号：2

配列の長さ：

配列の型：核酸

配列：WSNGT RCTRC TYCAN CANGT 21

配列番号：3

配列の長さ：2426

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

配列

AGCGCTAAGA CATCGAAGC CATATGGGCC GAATCGGACA ACAAAGCGAG CGAGTTCGAG	60
AGCACCCAC CGATGATTTC AACAAACGTG AAAAAGACGG TGAGCACGAG TGTAATCCAA	120
AGCGCCTTTT TCGACTGGGT TTGTGTTTTC ACGTGTGGAA GATGATGAAA ATCGTATGCT	180
CCAGGAGACA TAATACACCT CTTTTTATA ATAATTATTA ATTTATATCT ATTTAAATAT	240
AAAAAGTGCT AGGTGTGCAA AAAATTTATC GACAAATCCC ACAATTTTGT ATGGATTTTG	300
TCAAAAATA TAGATAATTT TTTCGAGGAA TGCAGCGGTG AAGTGGCGAA TAAGGAATAA	360
TGTGTGGCCA TCATCTTGCT TTGGAAAGGA TGCATACGG T TTG ATT GCG GCG AAT	416

Met Ile Ala Ala Asn

1 5

CCG ACG GAT TTG GAA GTG TAT TTG TTT CAT GAA GGC AGC TTG TAT AAA	464
Pro Thr Asp Leu Glu Val Tyr Leu Phe His Glu Gly Ser Leu Tyr Lys	

10 15 20

AGT TAC GAG CTG TTT GGC GCC CAT GTG ATT AAT GAG GGC GGG AAG GTC	512
Ser Tyr Glu Leu Phe Gly Ala His Val Ile Asn Glu Gly Gly Lys Val	

25 30 35

GGC ACC CGT TTT TGT GTT TGG GCG CCG CAC GCG CGC GAG GTG CGT CTT	560
Gly Thr Arg Phe Cys Val Trp Ala Pro His Ala Arg Glu Val Arg Leu	

40 45 50

GTC GGC AGT TTC AAC GAT TGG GAC GGG ACG GAT TTT CGC CTT GAG AAA	608
Val Gly Ser Phe Asn Asp Trp Asp Gly Thr Asp Phe Arg Leu Glu Lys	

55 60 65

GTG AAT GAT GAA GGG GTA TGG ACG ATT GTT GTC CCC GAA AAC TTG GAA	656
Val Asn Asp Glu Gly Val Trp Thr Ile Val Val Pro Glu Asn Leu Glu	

70 75 80 85

GGG CAT TTA TAT AAG TAT GAG ATT GTT ACG CCG GAC GGA CAG GTG CTG	704
Gly His Leu Tyr Lys Tyr Glu Ile Val Thr Pro Asp Gly Gln Val Leu	

【0193】また、本願発明のグルカンは、環状構造を除けば、通常の澱粉と同じ基本的構造を持つことから、生体内の酵素により容易にグルコースに分解されることができ、消化性に優れている。そのため、スポーツ飲料、スポーツ食品などにも使用され得る。

【0194】

【配列表】配列番号：1

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：WSNGT RCTRC TYCAN CANGT 21

起源 生物名：バチルス ステアロサーモフィラス (Bacillus stearothermophilus)

株名：TRBE14

配列の特徴 385-392 S SD配列

402-2357 P CDS

	90	95	100	
TTC AAA GCC GAC CCG TAC GCT TTT TAC TCC GAA TTG CGT CCT CAT ACC	752			
Phe Lys Ala Asp Pro Tyr Ala Phe Tyr Ser Glu Leu Arg Pro His Thr				
105	110	115		
GCC TCG ATT GCC TAC GAT CTG AAA GGA TAC CAG TGG AAC GAT CAA TCT	800			
Ala Ser Ile Ala Tyr Asp Leu Lys Gly Tyr Gln Trp Asn Asp Gln Ser				
120	125	130		
TGG AAG CGG AAG AAG CGA CGA AAA CGG ATT TAT GAT CAG CCC ATG GTG	848			
Trp Lys Arg Lys Lys Arg Arg Lys Arg Ile Tyr Asp Gln Pro Met Val				
135	140	145		
ATT TAT GAA CTC CAT TTC GGT TCG TGG AAG AAA AAA GAT GGG CGT TTT	896			
Ile Tyr Glu Leu His Phe Gly Ser Trp Lys Lys Lys Asp Gly Arg Phe				
150	155	160	165	
TAT ACG TAC CGT GAG ATG GCC GAT GAA CTG ATC TCG TAT GTG CTC GAT	944			
Tyr Thr Tyr Arg Glu Met Ala Asp Glu Leu Ile Ser Tyr Val Leu Asp				
170	175	180		
CAT GGG TTT ACG CAC ATT GAG TTG CTT CCT CTC GTC GAG CAT CCG CTC	992			
His Gly Phe Thr His Ile Glu Leu Leu Pro Leu Val Glu His Pro Leu				
185	190	195		
GAC CGC TCG TGG GGC TAT CAA GGA ACA GGG TAT TAT GCG GTA ACG AGT	1040			
Asp Arg Ser Trp Gly Tyr Gln Gly Thr Gly Tyr Tyr Ala Val Thr Ser				
200	205	210		
CGC TAT GGT ACG CCA CAC GAC TTC ATG TAC TTC GTC GAC CGT TGC CAT	1088			
Arg Tyr Gly Thr Pro His Asp Phe Met Tyr Phe Val Asp Arg Cys His				
215	220	225		
CAG GCG GGA ATC GGG GTC ATT ATG GAC TGG GTG CCG GGG CAT TTT TGC	1136			
Gln Ala Gly Ile Gly Val Ile Met Asp Trp Val Pro Gly His Phe Cys				
230	235	240	250	
AAG GAC GCC CAT GGG TTA TAT ATG TTT GAT GGC GCC CCG ACG TAT GAA	1184			
Lys Asp Ala His Gly Leu Tyr Met Phe Asp Gly Ala Pro Thr Tyr Glu				
255	260	265		
TAC GCG AAT GAA AAA GAC CGA GAA AAT TAC GTT TGG GGG ACG GCC AAT	1232			
Tyr Ala Asn Glu Lys Asp Arg Glu Asn Tyr Val Trp Gly Thr Ala Asn				
270	275	280		
TTT GAT TTA GGC AAG CCG GAA GTG CGC AGT TTT CTC ATC TCG AAC GCA	1280			
Phe Asp Leu Gly Lys Pro Glu Val Arg Ser Phe Leu Ile Ser Asn Ala				
285	290	295		
TTG TTT TGG CTC GAG TAT TAC CAT ATC GAC GGG TTC CGG GTC GAT GCG	1328			
Leu Phe Trp Leu Glu Tyr Tyr His Ile Asp Gly Phe Arg Val Asp Ala				
300	305	310		
GTT GCC AAT ATG CTT TAT TGG CCG AAC AAT GAC AGG CTG TAC GAG AAC	1376			
Val Ala Asn Met Leu Tyr Trp Pro Asn Asn Asp Arg Leu Tyr Glu Asn				
315	320	325	330	
CCG TAT GCG GTC GAG TTT TTG CGC AAG TTA AAC GAA GCG GTG TTT GCC	1424			
Pro Tyr Ala Val Glu Phe Leu Arg Lys Leu Asn Glu Ala Val Phe Ala				
335	340	345		
TAT GAT CCG AAT GCG CTG ATG ATT GCG GAA GAT TCG ACT GAC TGG CCG	1472			
Tyr Asp Pro Asn Ala Leu Met Ile Ala Glu Asp Ser Thr Asp Trp Pro				
350	355	360		
AAG GTG ACC GCG CCG ACG TAT GAA GGC GGA CTC GGC TTT AAT TAT AAA	1520			

Lys	Val	Thr	Ala	Pro	Thr	Tyr	Glu	Gly	Gly	Leu	Gly	Phe	Asn	Tyr	Lys	
		365					370				375					
TGG	AAC	ATG	GGC	TGG	ATG	AAC	GAC	ATG	CTG	AAG	TAC	ATG	GAA	ACA	CCG	1568
Trp	Asn	Met	Gly	Trp	Met	Asn	Asp	Met	Leu	Lys	Tyr	Met	Glu	Thr	Pro	
		380				385					390					
CCG	TAT	GAG	CGG	AGG	CAT	GTG	CAT	AAC	CAA	GTA	ACG	TTC	TCC	CTC	CTT	1616
Pro	Tyr	Glu	Arg	Arg	His	Val	His	Asn	Gln	Val	Thr	Phe	Ser	Leu	Leu	
390					395					400					405	
TAT	GCG	TAT	TCG	GAA	AAT	TTC	ATT	TTG	CCG	TTT	TCC	CAC	GAT	GAA	GTC	1664
Tyr	Ala	Tyr	Ser	Glu	Asn	Phe	Ile	Leu	Pro	Phe	Ser	His	Asp	Glu	Val	
				410					415					420		
GTG	CAT	GGC	AAA	AAA	TCG	CTG	CTC	AAT	AAA	ATG	CCA	GGG	TCG	TAT	GAA	1712
Val	His	Gly	Lys	Lys	Ser	Leu	Leu	Asn	Lys	Met	Pro	Gly	Ser	Tyr	Glu	
			425					430				435				
GAG	AAG	TTC	GCC	CAG	CTG	CGC	CTC	TTG	TAC	GGC	TAC	ATG	ATG	GCT	CAT	1760
Glu	Lys	Phe	Ala	Gln	Leu	Arg	Leu	Leu	Tyr	Gly	Tyr	Met	Met	Ala	His	
		440				445					450					
CCG	GGG	AAA	AAG	CTG	TTG	TTT	ATG	GGC	AAT	GAA	TTT	GCT	CAG	TTT	GAT	1808
Pro	Gly	Lys	Lys	Leu	Leu	Phe	Met	Gly	Asn	Glu	Phe	Ala	Gln	Phe	Asp	
		455				460				465						
GAA	TGG	AAG	TTT	GAG	GAT	GAA	CTC	GAT	TGG	GTG	CTG	TTT	GAT	TTT	GAG	1856
Glu	Trp	Lys	Phe	Glu	Asp	Glu	Leu	Asp	Trp	Val	Leu	Phe	Asp	Phe	Glu	
470					475					480					485	
CTG	CAC	CGG	AAG	ATG	AAC	GAT	TAC	ATG	AAA	GAG	TTA	ATC	GCC	TGC	TAT	1904
Leu	His	Arg	Lys	Met	Asn	Asp	Tyr	Met	Lys	Glu	Leu	Ile	Ala	Cys	Tyr	
				490					495					500		
AAA	CGG	TAT	AAG	CCG	TTT	TAC	GAA	TTG	GAT	CAT	GAC	CCG	CAA	GGA	TTT	1952
Lys	Arg	Tyr	Lys	Pro	Phe	Tyr	Glu	Leu	Asp	His	Asp	Pro	Gln	Gly	Phe	
		505						510					515			
GAA	TGG	ATT	GAC	GTT	CAC	AAC	GCT	GAA	CAA	AGC	ATT	TTC	TCA	TTC	ATC	2000
Glu	Trp	Ile	Asp	Val	His	Asn	Ala	Glu	Gln	Ser	Ile	Phe	Ser	Phe	Ile	
		520				525					530					
CGC	CGC	GGG	AAA	AAA	GAA	GAT	GAT	GTG	CTT	GTT	ATT	GTT	TGC	AAT	TTC	2048
Arg	Arg	Gly	Lys	Lys	Glu	Asp	Asp	Val	Leu	Val	Ile	Val	Cys	Asn	Phe	
		535				540					545					
ACA	AAT	CAG	GCG	TAT	GAC	GAC	TAC	AAA	GTT	GGA	GTG	CCG	TTG	CTC	GTA	2096
Thr	Asn	Gln	Ala	Tyr	Asp	Asp	Tyr	Lys	Val	Gly	Val	Pro	Leu	Leu	Val	
550					555					560					565	
CCG	TAT	CGG	GAA	GTG	CTG	AAT	AGC	GAT	GCG	GTC	ACG	TTT	GGT	GGA	TCG	2144
Pro	Tyr	Arg	Glu	Val	Leu	Asn	Ser	Asp	Ala	Val	Thr	Phe	Gly	Gly	Ser	
			570					575					580			
GGG	CAT	GTC	AAT	GGG	AAA	CGG	CTT	TCC	GCC	TTC	AAT	GAG	CCG	TTT	CAT	2192
Gly	His	Val	Asn	Gly	Lys	Arg	Leu	Ser	Ala	Phe	Asn	Glu	Pro	Phe	His	
		585				590						595				
GGT	AAA	CCA	TAC	CAC	GTG	CGC	ATG	ACG	ATT	CCG	CCA	TTT	GGC	ATT	TCC	2240
Gly	Lys	Pro	Tyr	His	Val	Arg	Met	Thr	Ile	Pro	Pro	Phe	Gly	Ile	Ser	
		600				605						610				
ATT	TTA	CGG	CCA	GTG	CAA	AAA	CGA	GGG	GAG	AGA	AAG	CGA	AAT	GAA	AAA	2288
Ile	Leu	Arg	Pro	Val	Gln	Lys	Arg	Gly	Glu	Arg	Lys	Arg	Asn	Glu	Lys	
		615				620						625				

GAA ATG CAT CGC CAT GTT ATT GGC CGG CGG GCA AGG AAG TCG GCT TCG 2336
 Glu Met His Arg His Val Ile Gly Arg Arg Ala Arg Lys Ser Ala Ser
 630 635 640 645
 CTC GCT GAC GAC AAA CAT CGC TAAACCGGCC GTGCCATTCG GCGGGAAGTA 2387
 Leu Ala Asp Asp Lys His Arg
 650
 CCGGATCATT GATTTTACAT TAAGCAATTG CACGAATTC 2426

【図面の簡単な説明】

【図1】本願発明の内分岐環状構造部分と外分岐構造部分とを有するグルカンの製造方法のひとつを示す模式図である。

【図2】図1で得られた反応生成物のゲル濾過パターンである。

【図3】本願発明の方法により得られるグルカンの態様を示す模式図である。

【図4】従来考えられていたCGTaseの反応を示す模式図である。図4Aは、アミロースに作用させた場合、図4Bは、アミロペクチンに作用させた場合を示す模式図である。

【図5】CGTaseをアミロペクチンに作用させた際の、生産物のゲルろ過クロマトグラフィーの溶出パターンの変化を示す図である。

【図6】新たなCTGaseの作用機構を示す図である。

【図7】CGTaseを作用させることにより、CD以外の高分子環状グルカンがつくられていることを示す図である。

【図8】本願発明の方法で得られるグルカンの構造決定をするための、各酵素によるグルカンの分解を示す模式図である。

【図9】各種アミラーゼ間の保存領域1および4の配列、および、この配列に対応する枝作り酵素のクローニングのためのプライマーを示す図である。

【図10】枝作り酵素遺伝子を含む入-TBE102の制限酵素地図を示す図である。

【図11】枝作り酵素の遺伝子を含むプラスミドの作製方法を示す図である。

【図12】実施例1で調製されたグルカンのカラムからの溶出パターンを示す図である。

【図13】グルコアミラーゼ耐性成分の分子量測定を行

った結果を示す図である。

【図14】グルコアミラーゼ耐性成分の各種糖質分解酵素による消化の結果、生じる糖を示す図である。

【図15】D酵素を用いて得られたグルカンの、ゲル濾過クロマトグラフィーを示す図である。

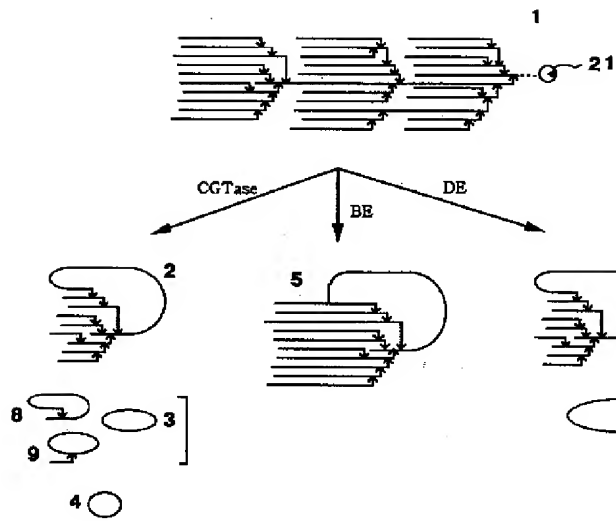
【図16】CGTaseを用いて得られたグルカンの、ゲル濾過クロマトグラフィーを示す図である。

【図17】実施例1で得られたグルカンが、澱粉の老化抑制効果を有することを示す図である。

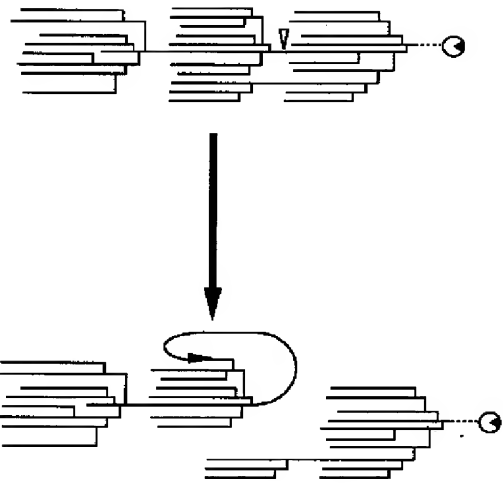
【符号の説明】

- 1 アミロペクチン
- 2 内分岐環状構造部分と外分岐構造部分とを有するグルカン
- 3 大環状CD
- 4 CD
- 5 内分岐環状構造部分と外分岐構造部分とを有するグルカン
- 6 内分岐環状構造部分と外分岐構造部分とを有するグルカン
- 7 環状 α 1, 4グルカン
- 8 内分岐CD
- 9 外分岐CD
- 11 アミロース
- 12 α -、 β -および γ -CD
- 13 非環状オリゴ糖
- 14 アミロペクチン
- 15 非環状リミットデキストリン
- 21 還元末端
- 23 分子内に環状構造を有するグルカン
- 25 分子内に環状構造を有するグルカン
- 26 環状グルカン
- 27 グルコース

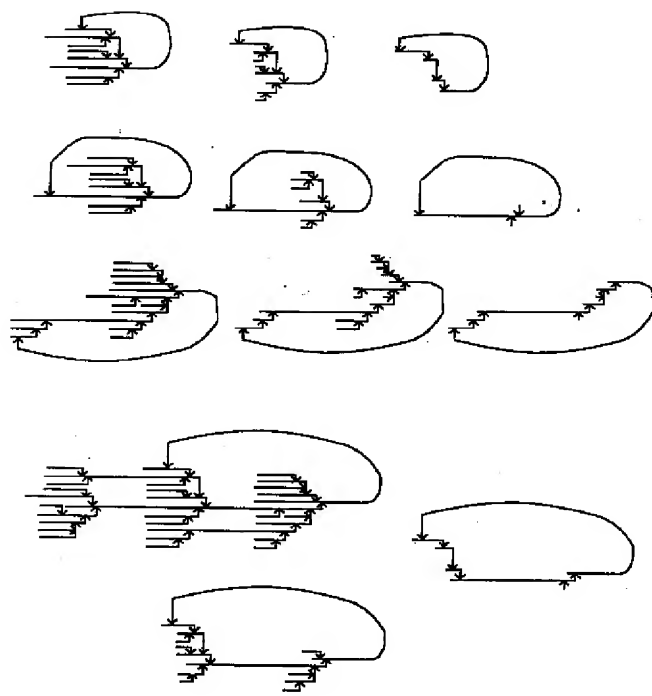
【図1】



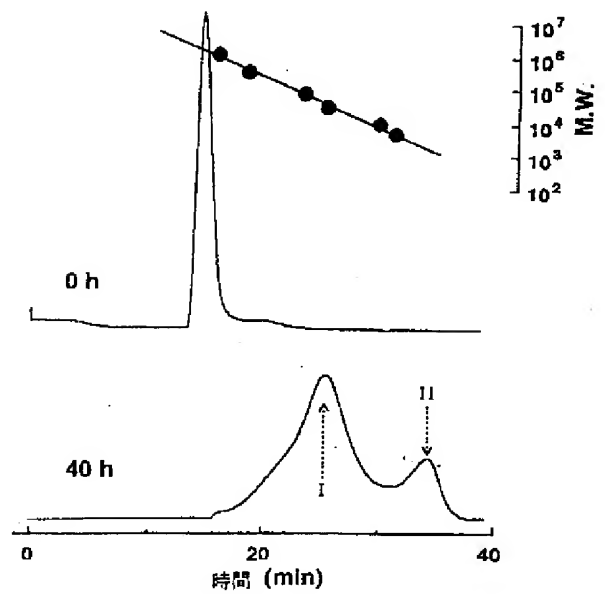
【図6】



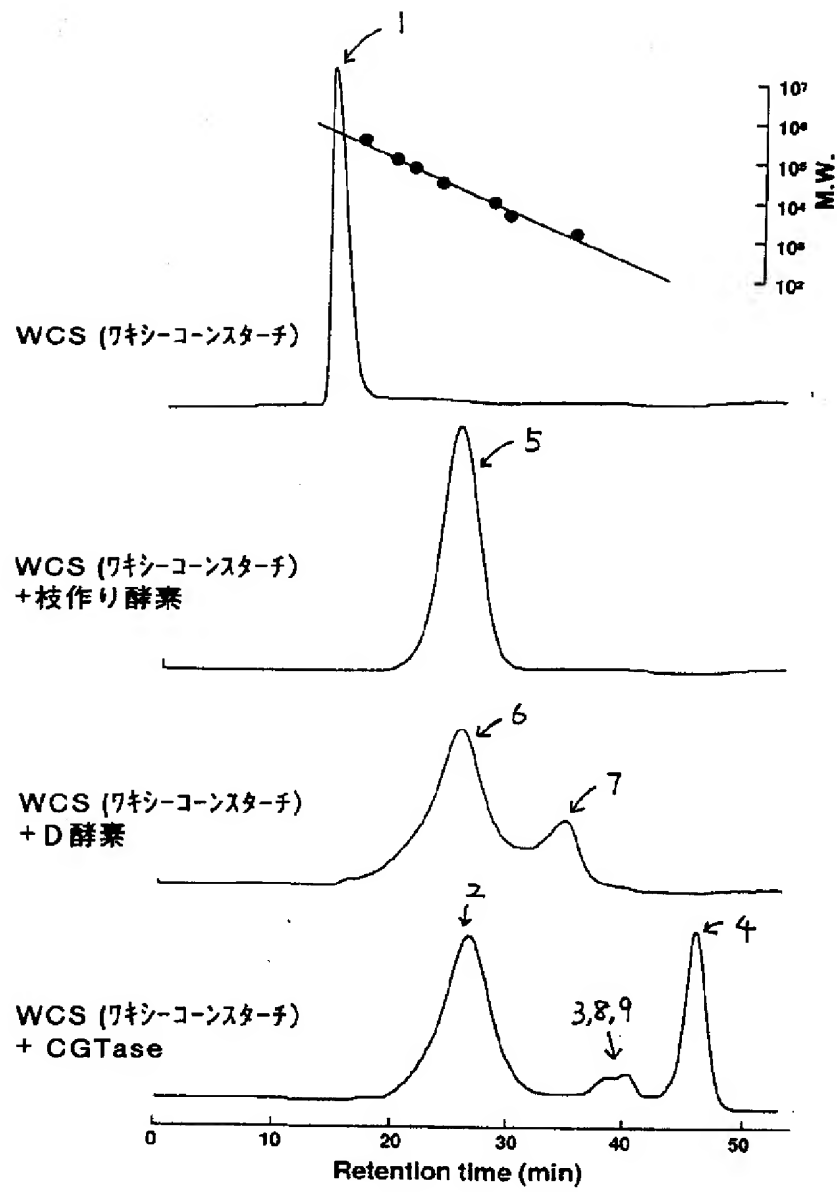
【図3】



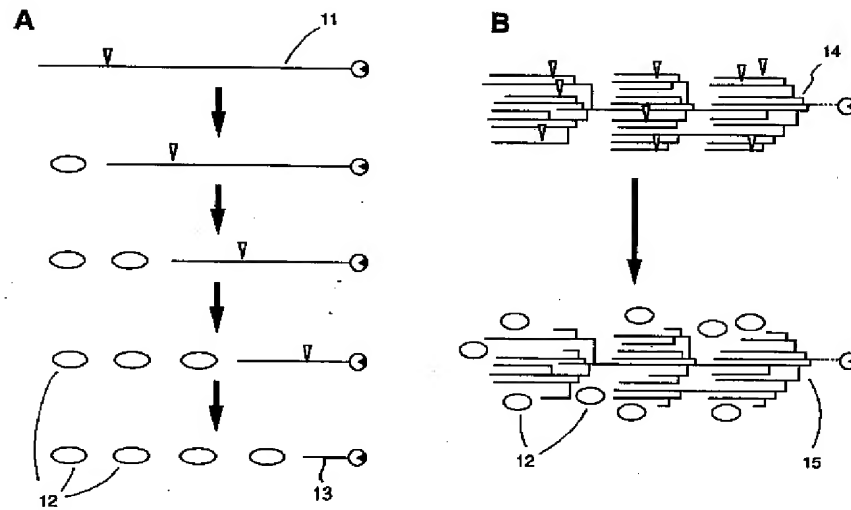
【図15】



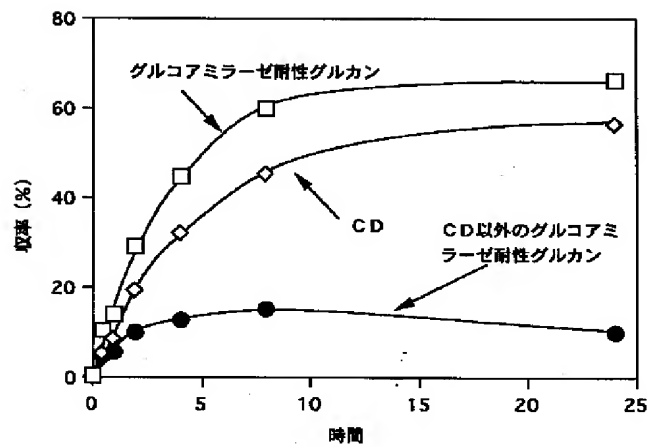
【図2】



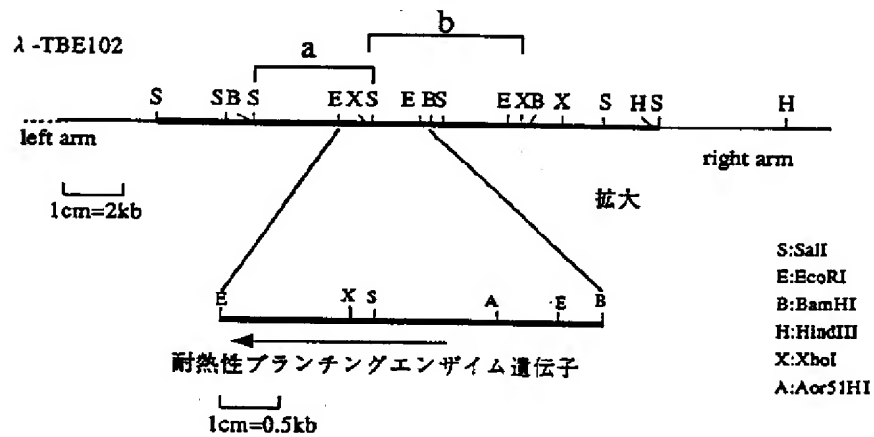
【図4】



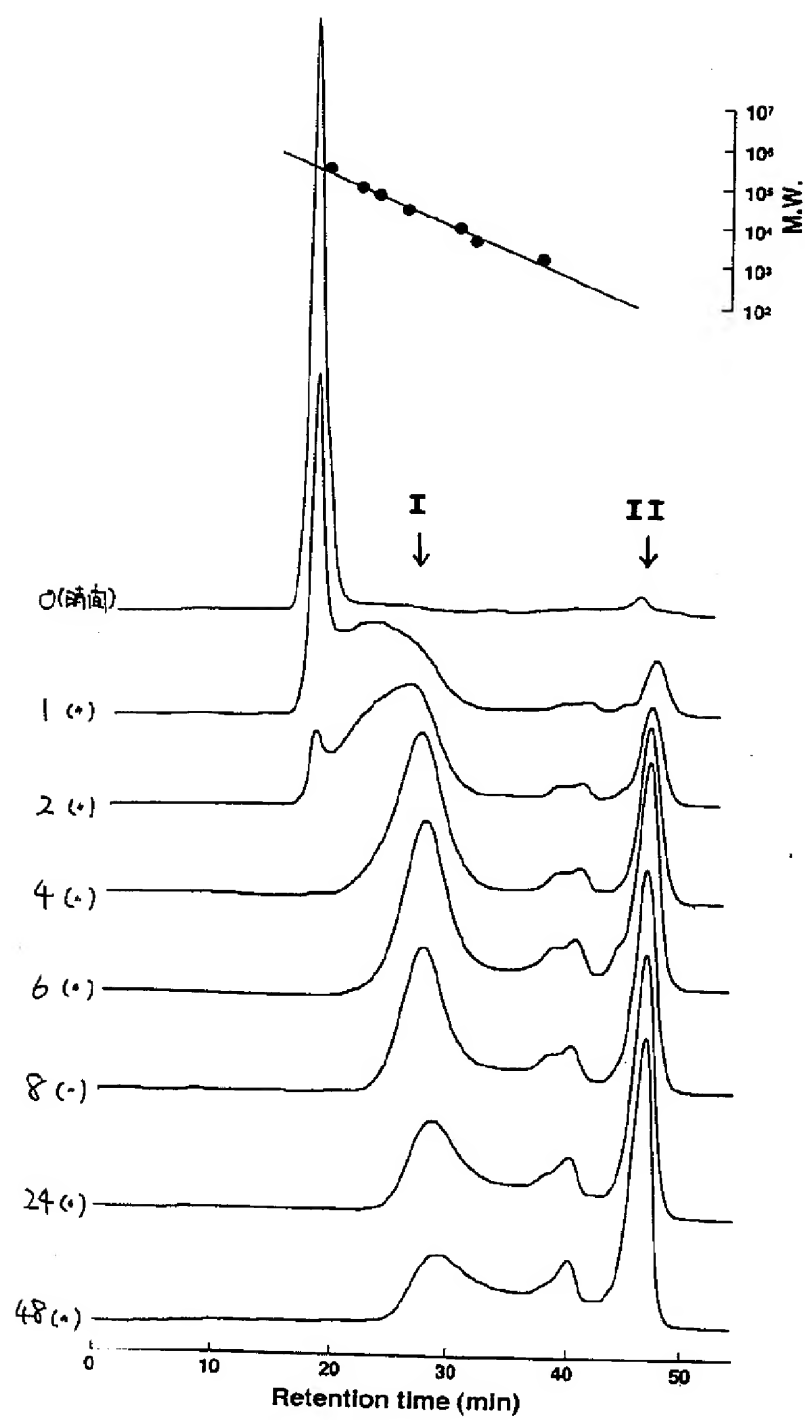
【図7】



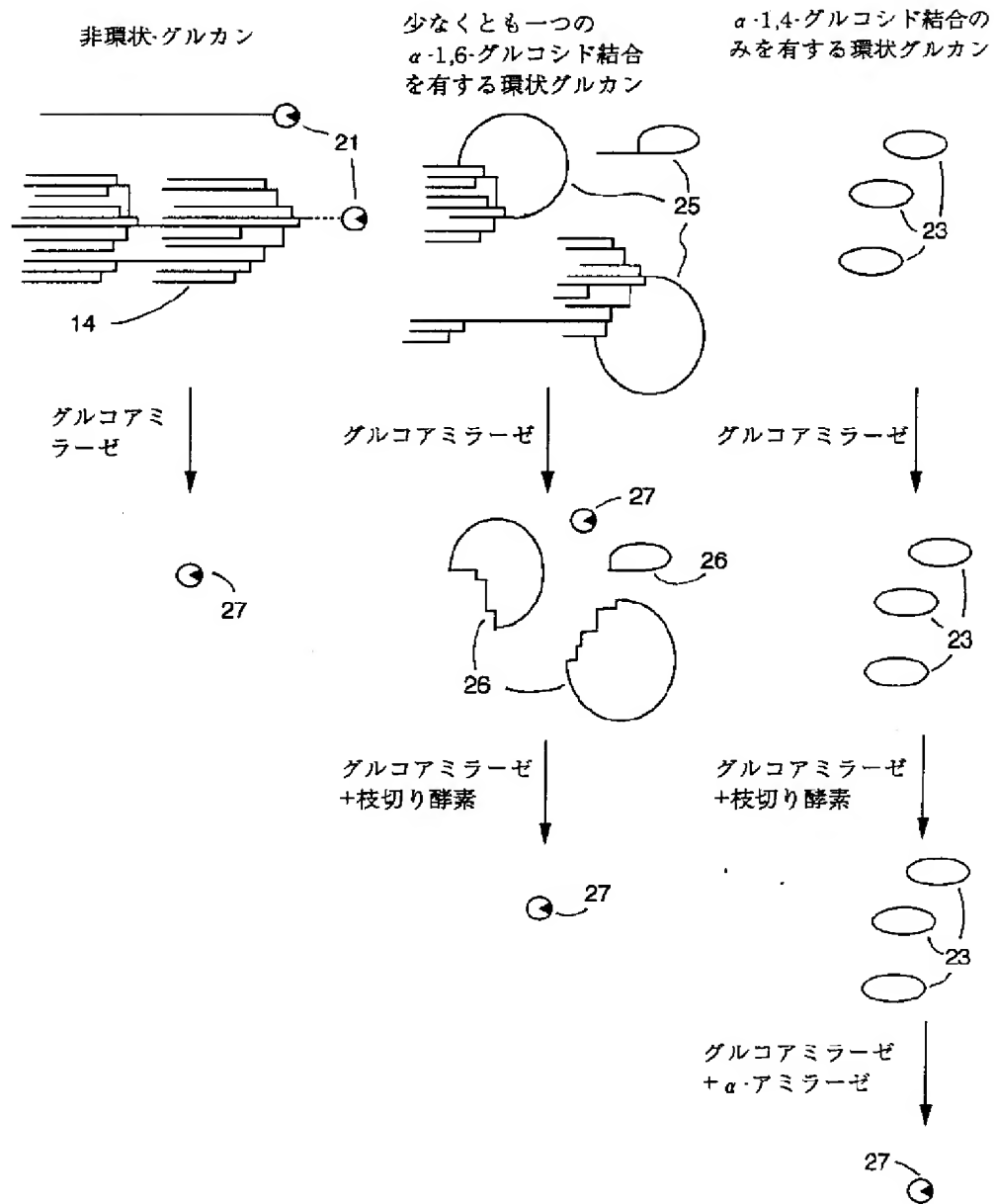
【図10】



【図5】



【図8】

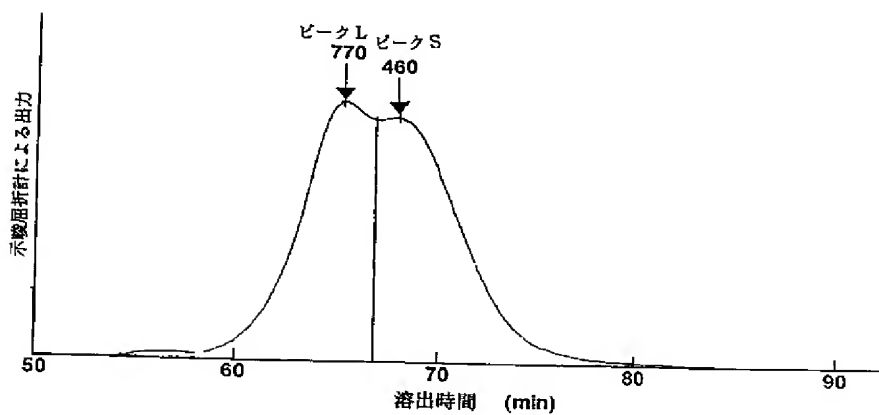


$\boxed{1 \ 2}$

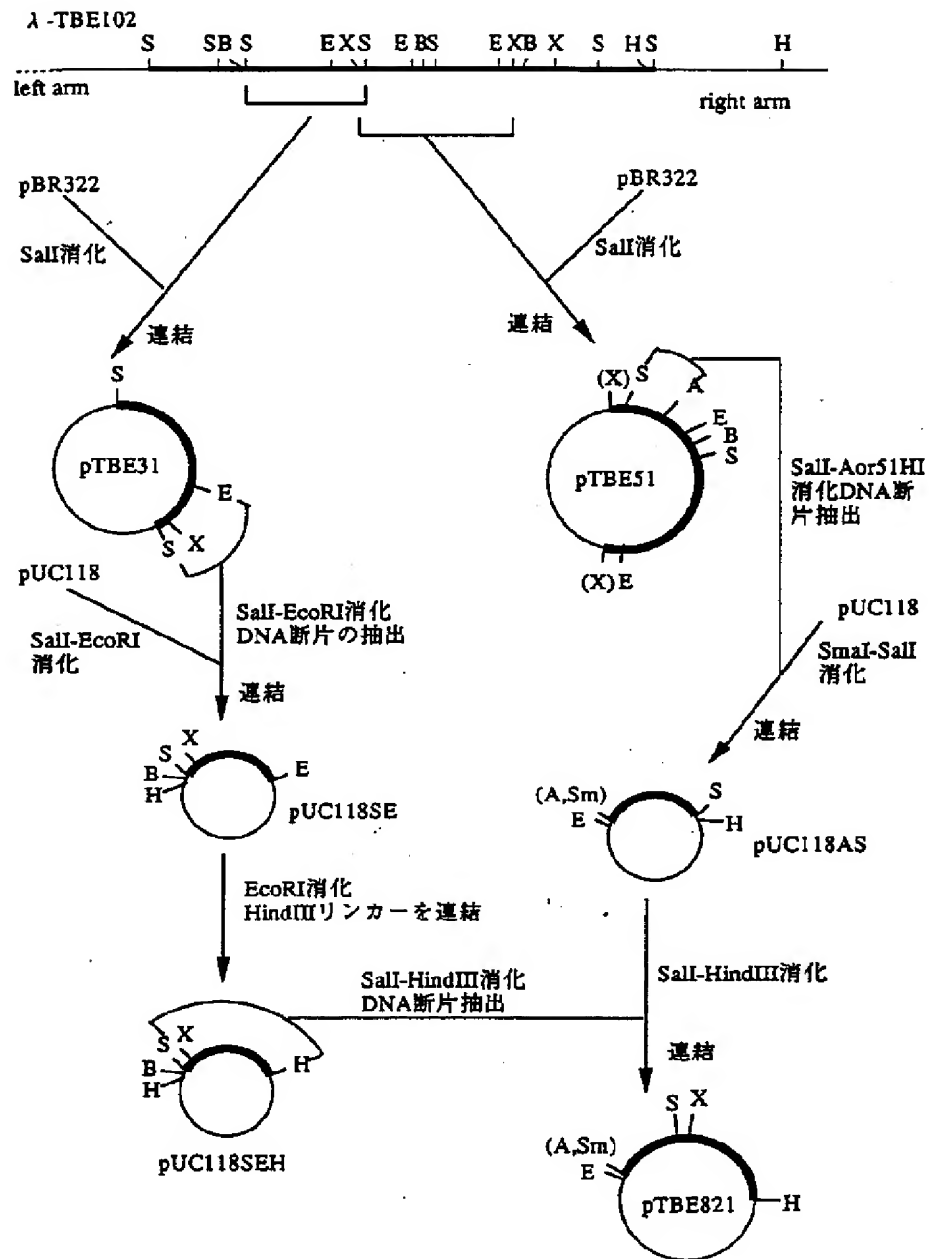
プライマー-1 5'GAYTGGGTNCCNGSNCA YTTY 3'

プライマー-4 3' WSN GTRCTCTCTY CANGTR 5'

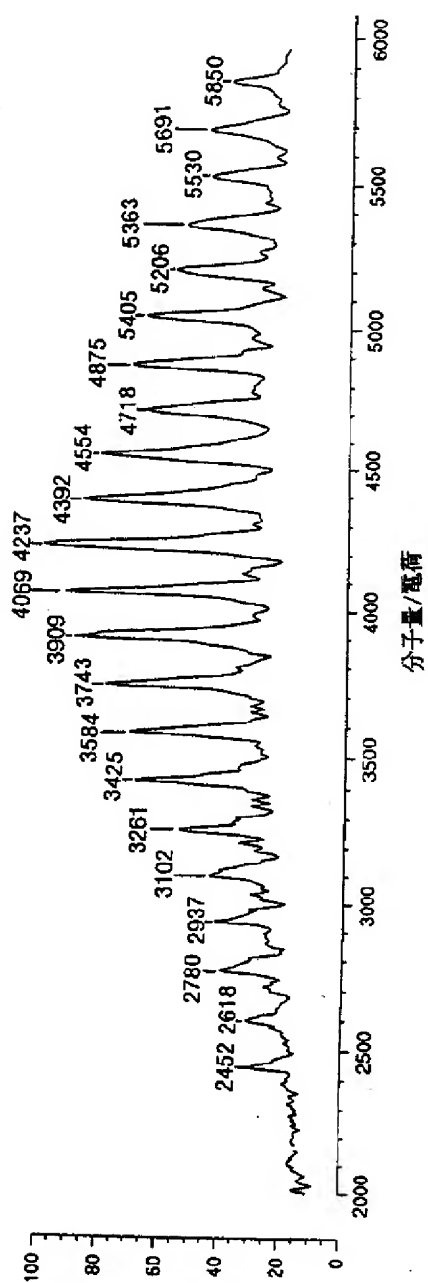
Y:T or C N:G or A or T or C S:G or C W:A or T R:A or G



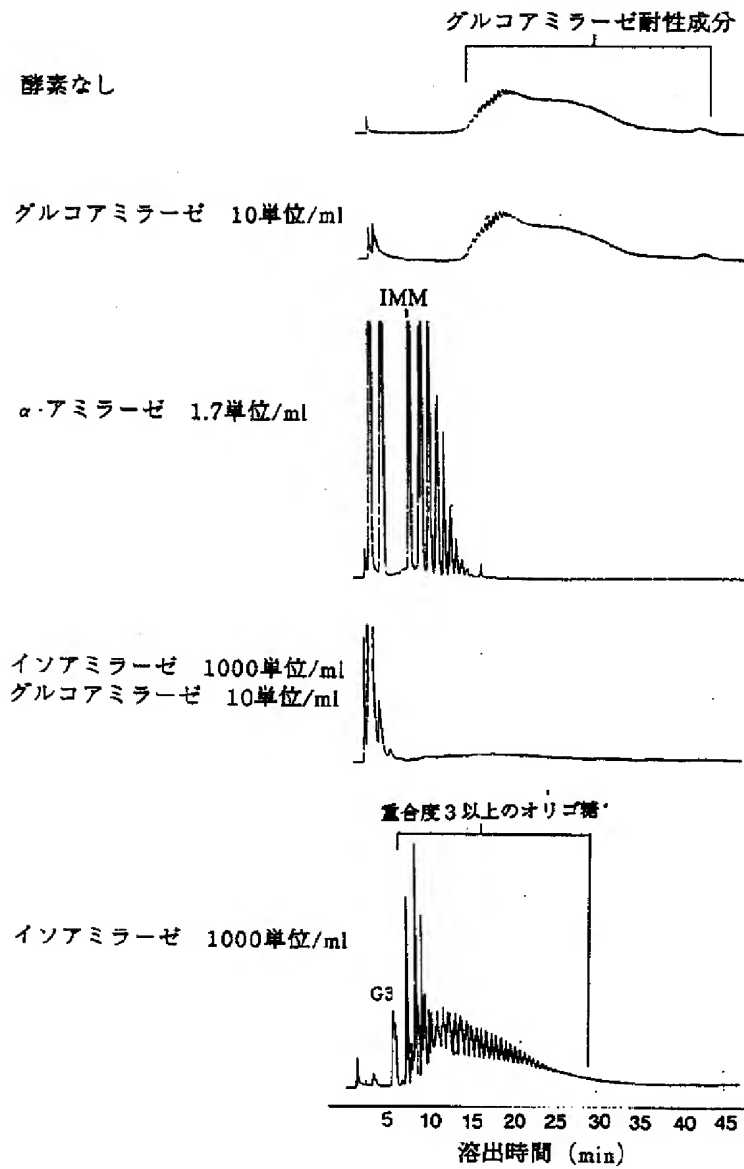
【図11】



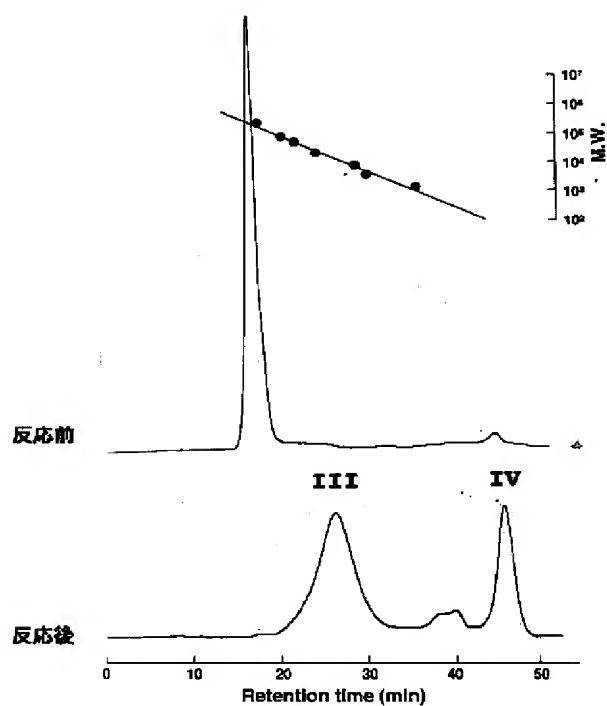
【図13】



【図14】

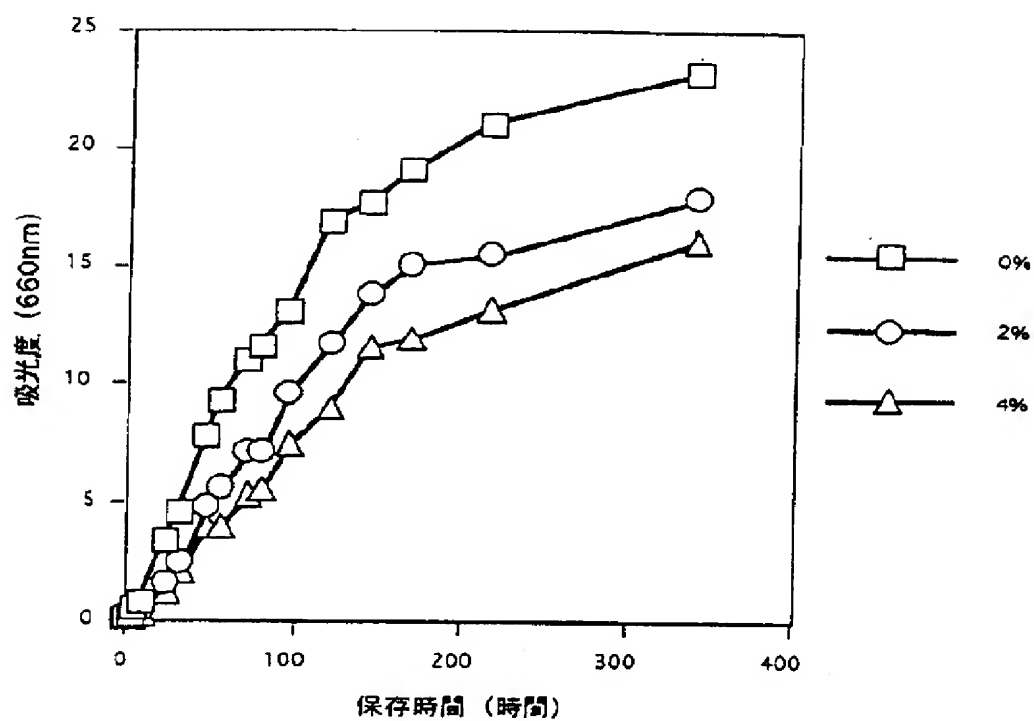


【図16】



【図17】

デンプンの老化抑制作用



フロントページの続き

(72)発明者 柳瀬 美千代
兵庫県加古郡播磨町大中508-94

(72)発明者 中村 弘康
兵庫県尼崎市水堂町1-30-33 江和寮内

(72)発明者 藤井 和俊
兵庫県尼崎市水堂町1-30-33 江和寮内

(72)発明者 寺田 喜信
大阪府大阪市西淀川区野里1丁目30-4
江親寮